

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO COMPARATIVO DO TESTE CUTÂNEO EM CÃES DE ÁREA ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR, UTILIZANDO DOIS ANTÍGENOS: LEISHVACIN^R E O P10.000G

Wagner Luiz Tafuri, Pedro Raso, Marco Victor Hermeto,
Daniel Vieira-Dias e Wilson Mayrink

A intradermorreação de Montenegro, um teste de hipersensibilidade tardia, é um método muito utilizado no diagnóstico auxiliar da leishmaniose tegumentar americana (LTA) humana. Entretanto, são escassos os relatos a respeito das alterações histológicas induzidas experimentalmente pelo teste cutâneo, sobretudo no cão. Frente a isso, a nível de campo, foram comparados dois testes cutâneos para diagnóstico da leishmaniose tegumentar canina (LTC), utilizando-se o Leishvacin^R e o P10.000G como antígenos. Nos cães que receberam o P10.000G, constatou-se reação inflamatória mais evidente e difusa que nos testados com o Leishvacin^R.

Palavras-chaves: Intradermorreação. Cão. Leishmaniose tegumentar. Antígenos Leishvacin^R e P10.000G. Histopatologia.

Nas Américas, as formas tegumentares de leishmaniose (leishmaniose tegumentar americana-LTA) são causadas por espécies dos complexos *Leishmania mexicana* e *Leishmania braziliensis* (encontrados em toda a América Latina desde o México até o Norte da Argentina, com exceção do Chile).

Os reservatórios naturais da doença são principalmente os roedores, edentados, marsupiais, procionídeos e primatas, incluindo o homem¹². A infecção em canídeos domésticos tem sido registrada em várias regiões do Brasil, tais como na Amazônia (região de Manaus), Bahia (região de Três Braços), Rio de Janeiro (Jacarepaguá), São Paulo (Vale do Ribeira), Espírito Santo (Viana) e Minas Gerais (Vale do Rio Doce). Entretanto, os autores dividem sua opinião com relação à importância desses animais na epidemiologia da doença, sendo que alguns os consideram reservatórios secundários da doença ou elo na cadeia de transmissão da infecção humana^{3 4 5 8 15}. Recentemente, Dias e col⁶ estudaram os aspectos clínicos da infecção em cães

provenientes da área de Virginópolis, Minas Gerais, Brasil.

A literatura referente ao estudo histopatológico de testes cutâneos, entre eles o teste de Montenegro é muito escassa^{2 7 16 17 20}. Com relação ao teste cutâneo tipo Montenegro em cães, Genaro e col^{9 10} utilizando cães experimentalmente infectados com *L. braziliensis* e empregando o antígeno descrito por Mayrink e col¹⁴ padronizaram a dose de inóculo em 200µg de proteína/0,1ml, bem como, identificaram histopatologicamente o tempo máximo de resposta em 72 horas. Os objetivos do presente trabalho são os de estudar a reação inflamatória no ponto de inóculo do antígeno no teste cutâneo, comparando o processo induzido por dois antígenos preparados em diferentes laboratórios - o Leishvacin^R ⁹ e o P10.000G¹³.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Município de Virginópolis, na região centro-nordeste do Estado de Minas Gerais (Vale do Rio Doce), Brasil. Todos os cães que participaram deste estudo foram examinados durante uma investigação epidemiológica em uma área rural de Virginópolis que passava por um surto humano de LTA. Dos 91 cães examinados, seis apresentaram lesões características de LTA, com pesquisa de *Leishmania* positiva.

Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal e de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Endereço para correspondência: Dr. Wagner Luiz Tafuri, Depto. de Patologia Geral/ICB/UFMG, Caixa Postal 2486, 30161-970 Belo Horizonte, MG.

Recebido para publicação em 12/11/92.

Após o exame ectoscópico à procura de lesões suspeitas, os cães receberam, nas faces internas das coxas, injeções dos dois antígenos (Leishvacin^R na coxa direita e P10.000G na esquerda), aplicados por via intradérmica. Os pontos de injeção foram devidamente dermatografados. O Leishvacin^R foi cedido pela Biobrás (Bioquímica do Brasil - S.A.), e trata-se de um extrato de promastigotas mortas de 5 cepas de *Leishmania ssp* dermatotrópicas, primariamente empregado como vacina anti-LTA e produzido industrialmente para testes¹⁴. O P10.000G é uma fração subcelular de *Leishmania braziliensis* preparada e gentilmente cedida pelo Dr. Mauro C. A. Marzochi da FIOCRUZ, Rio de Janeiro¹³. Ambos antígenos foram aplicados na dosagem de 200µg de proteína/cão.

Decorridas 72 horas, as áreas de induração foram mensuradas, de acordo com a técnica de Pellegrino¹⁸ realizando-se, então, biópsias nos pontos de inóculo em 24 cães entre os que apresentaram testes positivos (diâmetro médio da induração maior ou igual a 5mm).

As biópsias obtidas foram fixadas em formol a 10% tamponado (pH 7,2), desidratadas, diafanizadas, embebidas em parafina, cortadas e montadas em lâminas, segundo técnicas rotineiras de histopatologia. As lâminas foram coradas pelos métodos de hematoxilina-eosina (HE) e "Periodic Acid Schiff" (PAS), para melhor visualização das alterações do colágeno.

RÉSULTADOS

Reação ao Leishvacin^R: O ponto de injeção do Leishvacin^R mostrou reações cujas principais alterações histopatológicas, observadas, na maioria dos animais, podem ser assim resumidas: a. reação inflamatória, mais freqüentemente em focos múltiplos, dispostos em torno de vasos, anexos e nervos, com exsudato composto predominantemente por células mononucleares, sem aspecto granulomatoso, e localizado principalmente na hipoderme e na derme profunda (Figura 1); b. em alguns casos, o exsudato inflamatório era esparso, sobretudo na derme superficial, porém menos intenso que na derme profunda e na hipoderme (Figura 2); c. não raro, junto com o exsudato de células mononucleares, havia células plasmáticas, granulócitos neutrófilos e raros granulócitos

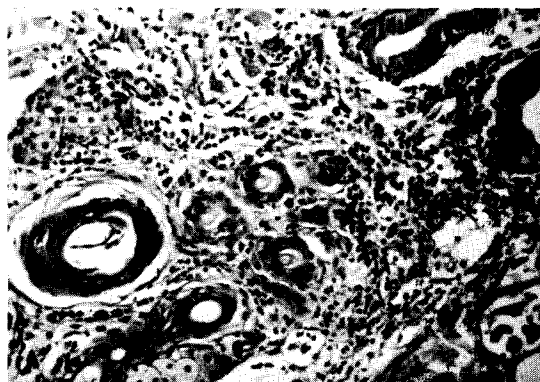


Figura 1 - Cão proveniente de Virginópolis (Leishvacin^R). Observa-se infiltrado acentuado de células mononucleares ao redor de vasos e anexos da derme profunda. HE. x 160.

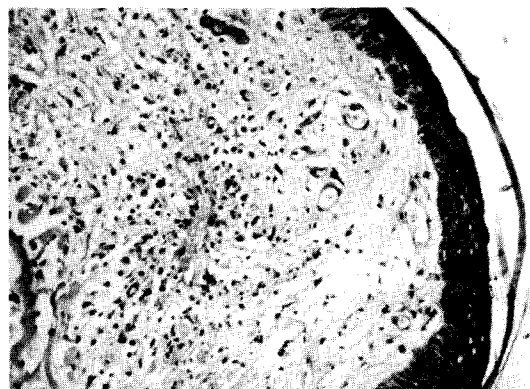


Figura 2 - Cão proveniente de Virginópolis (Leishvacin^R). Nota-se infiltrado moderado e esparso de células mononucleares na derme superficial. HE. x 160.

eosinófilos; d. edema, geralmente moderado, com afastamento das fibras colágenas, principalmente nas porções mais superficiais da derme e próximo aos focos de inflamação, em alguns casos ligados mais à introdução do antígeno que propriamente à inflamação por ele desencadeada; e. zonas de necrose hialina e/ou fibrinóide, inconstantes, geralmente pequenas e esparsas, com destruição de fibras colágenas, quase sempre topograficamente relacionadas aos focos inflamatórios; f. congestão, edema e ectasia de vasos linfáticos, variando de discreto a intenso. Em alguns animais, notaram-se ainda focos de hemorragia na hipoderme, recentes e traumáticos, não decorrentes da ruptura de vasos

diretamente ligados à inflamação.

Entre as alterações secundárias, de intensidade variável, geralmente discretas ou moderadas, destacam-se: alterações da epiderme, representadas pela hiperqueratose, acantose, atrofia, vacuolização das células da camada de Malpighi, bolha subepidérmica e edema intercelular; fenômenos degenerativos ocasionais das células epiteliais dos ductos de glândulas sudoríparas; alterações das terminações nervosas, inconstantes e raras, traduzidas por vacuolização de algumas células das bainhas nervosas e ectasia de vasos linfáticos da derme, sendo esse um achado freqüente.

Reação ao antígeno P10.000G: As alterações histopatológicas foram qualitativamente as mesmas descritas para o grupo anterior. Todavia, eram mais pronunciadas, com destaque especial para a maior intensidade da reação inflamatória e sua tendência a ser difusa, principalmente na derme superficial (Figura 3).

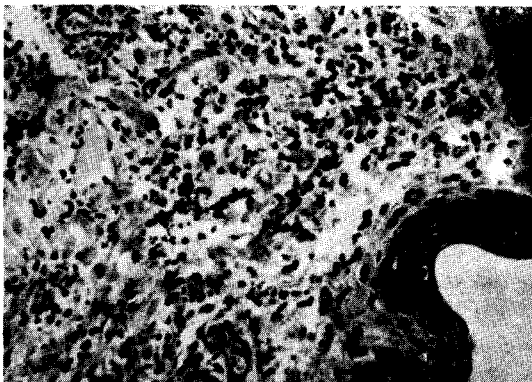


Figura 3 - Cão proveniente de Virgíópolis (P10.000 G). Infiltrado intenso e esparsos de células mononucleares na derme superficial. HE. x 160.

DISCUSSÃO

O teste cutâneo com reação de hipersensibilidade tardia é um excelente método auxiliar no diagnóstico da leishmaniose tegumentar humana, aplicado desde os trabalhos iniciais de Montenegro¹⁷.

Entretanto, antígenos empregados no diagnóstico humano não conseguiram produzir, em cães doentes, reações cutâneas consistentes ou

falharam em determiná-las, de acordo com as observações de Herrer¹¹, no Peru, e Pirmez e col¹⁹ no Brasil. Porém, resposta cutânea eficaz no cão foi inicialmente obtida por Barbosa-Santos & Marzochi em 1986¹ e por Marzochi em 1988¹³, empregando o antígeno P10.000G, uma fração subcelular da *L. braziliensis*, empregada na dosagem de 200µg de proteína por inóculo. Da mesma forma, Genaro e col^{9,10} trabalhando com um extrato de promastigotas mortas de *Leishmania*¹⁴ conseguiram demonstrar a existência da resposta cutânea de hipersensibilidade retardada em cães experimentalmente infectados com *L. braziliensis*. Esses autores analisaram histologicamente a reação cutânea, determinando o tempo de 72 horas como ideal, para a leitura do teste cutâneo em cães com LTA, já que este foi o período onde a reação mostrou-se mais pronunciada.

No presente trabalho, todos os animais biopsiados apresentaram reação inflamatória a ambos os antígenos, embora a intensidade dessa reação fosse variável. De fato, a reação induzida pelo antígeno P10.000G, em geral, era mais pronunciada e intensa, com exsudato inflamatório mais difuso, principalmente na derme superficial. Esse quadro histológico foi compatível com a leitura clínica do teste, já que as indurações foram quase sempre mais evidentes com o P10.000G. Apesar disso, o tipo de reação foi qualitativamente o mesmo para os dois antígenos. A explicação para essas diferenças poderia ser decorrente dos métodos empregados na preparação dos antígenos, já que o Leishvacin^R é composto de um extrato bruto de promastigotas mortas e o P10.000G é uma fração subcelular de promastigotas de *L. braziliensis*.

SUMMARY

The Montenegro skin test is widely used as a diagnostic method for American cutaneous leishmaniasis (ACL). However, there is little information about the histological changes that occur after administration of the antigen, especially in dogs. Two intradermal reactions were used in mongrel dogs during a clinical and epidemiological study as a diagnostic method for canine cutaneous leishmaniasis at Virgíópolis, Minas Gerais, Brazil. Leishvacin^R and P10,000G were used as antigens. The inflammatory reaction was more intense and diffuse in dogs tested with P10,000G than Leishvacin^R.

Key-words: Skin test. Dog. Cutaneous leishmaniasis. Leishvacin^R and P10,000G antigens. Histopathology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barbosa-Santos EO, Marzochi MCA, Silva VL, Conceição NF, Silva PCT, Santos C. Elicitation of the delayed hypersensitivity reaction in canine mucocutaneous leishmaniasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 81(supl.):146, 1986.
2. Buss G. Untersuchen mit Leishmania-vakzin. Archives Schiffs Tropic-Hygiene 33:65-83, 1929.
3. Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MCA, Tramontano N. A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 80:17-22, 1985.
4. Deane LM, Grimaldi Jr G. Leishmaniasis in Brazil. In: Chang KP, Bray RS (eds) Human Parasitic diseases. 1st edition, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford p.247-280, 1985.
5. Dias M, Mayrink W, Deane LM, Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Batista SM, Araújo FG, Coelho MV, Willians P. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana. I- Estudo de reservatórios em área endêmica do Estado de Minas Gerais. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 19:403-410, 1977.
6. Dias DV, Hermeto MV, Mayrink W. Estudo clínico laboratorial e epidemiológico em um foco de Leishmaniose Tegumentar, na Bacia do Suaçuí, Minas Gerais. In: IV Encontro de Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte p.30, 1991.
7. Dostrovsk A. The diagnostic value of leishmania vaccine. American Tropical Medicine and Parasitology 29:123-128, 1935.
8. Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi FG, Sessa PA, Carias VRD, Jesus AC, Alencar JTA. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito do Santo, Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 81:155-163, 1986.
9. Genaro O, Mayrink W, Raso P, Dias M, Pinto TM, Costa CA, Willians P, Michalick MSM, Mello MN, Magalhães PA, Costa RT, Oliveira-Lima A. Kinetics of Montenegro skin test in dogs infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 83 (supl.):163, 1989.
10. Genaro O, Raso P, Costa CA, Carvalho MD, Amaral F, Botelho ACC, Williams P, Dias M, Mayrink W. Montenegro skin tests in dogs experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 87:163-164, 1992.
11. Herrer A. Estudios sobre leishmaniasis tegumentaria en el Peru. V. Leishmaniasis natural en perros procedentes de localidades utogenas. Revista de Medicina Experimental (Lima) 8:87-117, 1951.
12. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick K (eds) The leishmaniasis in Biology and Medicine. 1st edition, Academic Press, London, p.1-20, 1987.
13. Marzochi MCA, Barbosa-Santos EGO. Evaluation of a skin test on the canine mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 83:391-392, 1988.
14. Mayrink W, Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Dias M, Oliveira-Lima A, Michalick MS, Willians P. A field trial of a vaccine against American leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 73:385-387, 1979.
15. Mayrink W, Magalhães PA, Melo MN, Dias M, Costa CA, Michalick MSM, Willians P. Canine cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas State Brazil. Transaction Royal Society of Tropical Medicine Hygiene 75:757-758, 1981.
16. Mayrink W, Schettini APM, Willians P, Raso P, Magalhães PA, Lima AO, Melo MN, Costa CA, Genaro O, Dias M, Michalick, MSM. Histological observations of Montenegro's reaction in man. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 31:256-261, 1989.
17. Montenegro J. A cútis reação na leishmaniose. Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo 1:161-164, 1926.
18. Pellegrino J. Nota preliminar sobre a reação intradérmica feita com fração polissacarídica isolada de formas de cultura da *Leishmania braziliensis* em casos de leishmaniose tegumentar americana. O Hospital 34:149-153, 1951.
19. Pirmez C, Marzochi MCA, Coutinho SG. Experimental canine mucocutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 83:145-151, 1988.
20. Portugal H, Gimenez M. Histologia da reação de Montenegro (nota prévia). Anais Brasileiros de Dermatologia e Sifilogia 18:176-179, 1943.