

# Intradermorreação de Montenegro em cães (Mammalia: Canidae) experimentalmente inoculados por *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), principais agentes causadores de Leishmaniose Tegumentar na Amazônia<sup>1</sup>

Sônia Rolim REIS<sup>2</sup>, Rogério Farias NAIFF<sup>3</sup>, Flávia Naief ALMEIDA-CAMPOS<sup>4</sup>, Antonia Ramos FRANCO<sup>5</sup>

## RESUMO

O teste de intradermorreação de Montenegro é utilizado para detectar infecção por *Leishmania* em humanos. A técnica se baseia numa reação de hipersensibilidade tardia. Os antígenos de Montenegro utilizados no experimento são soluções de antígenos homólogos brutos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L.(V) guyanensis*. Este experimento demonstrou que os animais inoculados com as espécies de *Leishmania* inoculadas desenvolveram enduração no local do teste mais acentuada que os animais controle. Os resultados sugerem que o teste cutâneo pode vir a ser indicado como método auxiliar de diagnóstico em cães infectados por *Leishmania* sp.

**PALAVRAS-CHAVE:** Intradermorreação de Montenegro, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania braziliensis*, cão, Amazônia

# Montenegro's skin test in dogs (Mammalia: Canidae) experimentally inoculated with *Leishmania guyanensis* and *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) the main agents of Amazônia Tegumentary Leishmaniasis

## ABSTRACT

Positive Montenegro's skin test is a delayed type hypersensitivity reaction widely used as indicative of infection with *Leishmania*. Montenegro's antigen consisted of a crude *Leishmania* homologous antigen solution that was used as a skin test in five dogs experimentally inoculated with *Leishmania (Viannia)* spp. In this work it is shown that all animals infected presented an induration at the site of injection in contrast of the dogs non infected used as a control group. This demonstrated that the skin tests in dogs could be used to make an diagnosis of the *Leishmania* infection.

**KEY-WORDS:** Montenegro's skin test, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania braziliensis*, dog, Amazônia.

<sup>1</sup> Financiada pelo INPA e Projeto Temático – Amazônia Verde – FAPEAM, Processo no. 891/2003. Aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisas do Centro Universitário Nilton Lins - Processo: 001/2004 - EXT/CEP.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas com projeto de pesquisa na área de concentração em Leishmaniose Tegumentar Canina. reis@inpa.gov.br

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas com projeto de pesquisa na área de concentração em Leishmaniose Tegumentar Canina / clínica de pequenos animais, rogerionaiiff@hotmail.com

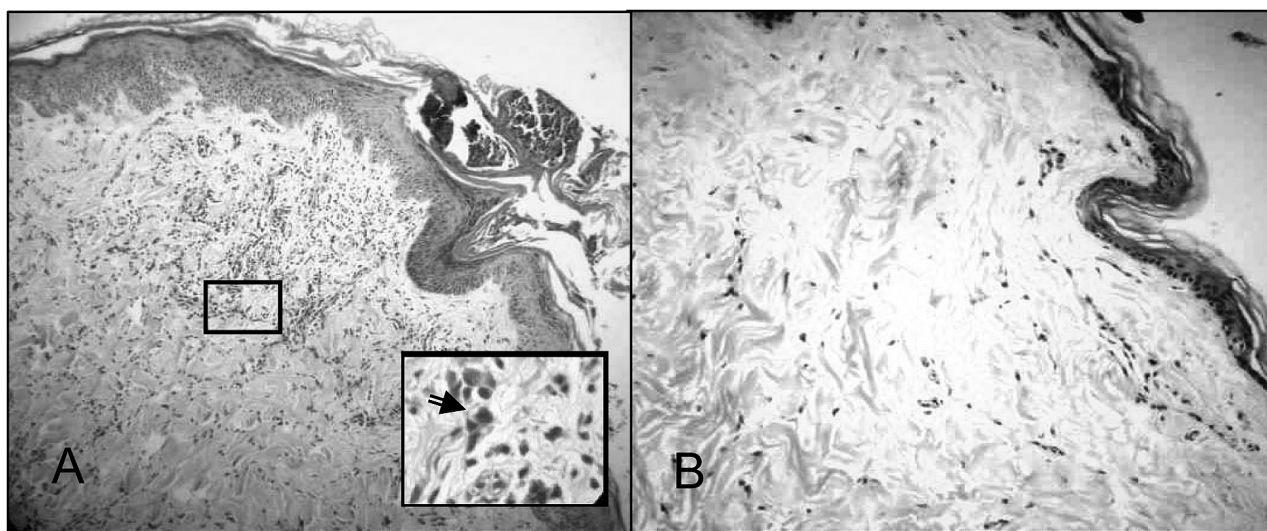
<sup>4</sup> Professora de graduação e pós-graduação do Instituto de Ciências Biológicas da UFAM. fracampos@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Pesquisadora do INPA, coordenadora do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas CPCS/INPA. afranco@inpa.gov.br

Apesar de ser uma antrozoose originalmente silvestre, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) tem sido descrita por diversos autores ocorrendo em ambientes domésticos e peridomésticos e os animais domésticos, o cão em especial, pode ser acometido por essa doença (o cão já foi incriminado como hospedeiro de LV, mas não de LTA) nesses locais. Na Amazônia, e em particular, no estado do Amazonas, a incidência de Leishmaniose Tegumentar vem aumentando significativamente, acompanhando a abertura de novas estradas e instalação de novos núcleos residenciais, em áreas onde, previamente, existia densa floresta tropical (Talhari et al, 1988). Pouco se conhece sobre os aspectos clínicos, parasitológicos e imunológicos do curso da infecção da LTA em cães tornando-se necessários mais estudos para elucidar esses aspectos (Madeira et al., 2003). O teste de intradermorreação de Montenegro (IDRM) tem valor no diagnóstico, classificação das formas clínicas, acompanhamento do tratamento e detecção precoce de recidivas, sendo utilizadas como critério de cura em humanos . (Tafuri, 1992).

Foram selecionados sete cães (*Canis familiaris*) de várias ninhadas com aproximadamente cinco meses de idade, sem raça definida, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Manaus, Amazonas, Brasil. Os cães foram divididos em dois grupos, de acordo com a espécie de *Leishmania* inoculada. Dos sete animais, três foram inoculados com 0,1 mL por via intradérmica contendo a concentração de  $10^7$  promastigotas/mL de *Leishmania (V.) guyanensis*, cepa MHOM/BR/95/IM4143 (Grupo Lg). Dois cães foram inoculados com 0,1 mL por via intradérmica de suspensão antigênica contendo  $10^6$  promastigotas/mL de *Leishmania (V.) braziliensis*, cepa MHOM/BR/95/IM4102 (Grupo Lb). Dois cães não foram inoculados e serviram como controle (grupo C). No mesmo

dia da inoculação dos cães, foram inoculados 10 hamsters (*Mesocricetus auratus*) com *L (V) braziliensis* e 10 hamsters com *L (V) guyanensis* para verificação da infectividade de cada um dos inóculos. Formas promastigotas de leishmânia foram obtidas após serem isoladas por inoculação de fragmentos de tecido subcutâneo a partir de lesões de hamsters em meio de cultura NNN. Os parasitas foram amplificados em base de NNN contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) e gentamicina (2,5 mL) como fase líquida. A massa de parasitas obtida foi submetida a cinco ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (37°C) bruscos para rompimento dos parasitas. Posteriormente foi feita a dosagem de proteína pelo método de Bradford (1976). Ao extrato obtido foi adicionada solução antiproteolítica (0,04 M NaCl; 0,01 M EDTA; 0,001M PMSF; 0,01M Iodoacetamida; 0,005 M Fenoltaleína e 0,01 M Tris - pH 8,0) e o mesmo foi aliquoteado e mantido a -70°C até o momento da sua utilização (Leon et al, 1992 ) A concentração do antígeno utilizada por teste foi de 200µg/0,1mL. Trinta dias após a inoculação dos cães foi realizado nos três grupos de estudo (Lg, Lb e C) teste de intradermorreação, utilizando-se antígeno bruto de leishmânia homóloga a fim de medir a reação de hipersensibilidade tardia. O teste foi realizado na região torácica no lado esquerdo e na região contralateral foi inoculada solução salina para controle da reação. Quarenta e oito horas depois foram realizadas as medições da reação sendo demarcada a dimensão da área de endureção em milímetros Setenta e duas horas após foi realizada biópsia, tanto no local da IDRM quanto no local da injeção de solução salina, montadas lâminas de tecidos para realizar estudo comparativo das alterações histopatológicas através do exame ótico de lâminas coradas pela Hematoxilina – Eosina.



**Figura 1** - Cortes histológicos corados pela HE de pele de cão inoculado com antígeno solúvel de *Leishmania braziliensis* (A) seta mostrando presença de células de infiltrado inflamatório (50X e 400X); e área contra-lateral (B) onde foi injetado solução salina (100X).

Dos 10 hamsters do grupo Lb utilizados como controle do inóculo, todos apresentaram lesões cutâneas 60 dias após inóculo. Dos 10 hamsters do grupo Lg todos os animais apresentaram lesões cutâneas 45 dias após o inóculo, confirmando-se assim a infectividade do parasita utilizado no estudo experimental em ambos os grupos. Os animais do grupo C que foram inoculados com antígeno de *L (V) braziliensis* e *L (V) guyanensis* desenvolveram áreas de endureção de 5 e 8 mm de diâmetro respectivamente. Não foram observadas reações locais nas áreas contralaterais em nenhum dos animais onde foi injetada solução salina, sejam eles do grupo experimental ou do controle. Áreas de endureção no local de injeção do antígeno, nos três animais inoculados com *L (V) guyanensis* apresentaram elevada reatividade 48 horas após a injeção, com média de 13 mm (valor máximo 15 mm e valor mínimo 8 mm) de diâmetro, sendo que em um deles foi observada a presença de fissura e crostas no local 72 horas após o teste. Os animais inoculados com *L (V) braziliensis* obtiveram uma média de endureção de 9,5 mm (valor máximo 11 mm e valor mínimo 5 mm). Estes resultados demonstram a intensa reatividade celular e o envolvimento de células de memória do sistema imunológico (Linfócito T) envolvidas no processo de infecção por estes parasitas nos cães. Esta reação de hipersensibilidade tardia favorece a utilização da intradermorreação como método de diagnóstico, no rastreamento da infecção de cães por protozoários do gênero *Leishmania* (Marzochi & Barbosa-Santos, 1988). Foram observadas a presença de infiltrado inflamatório com células mononucleares e plasmócitos, e edema na derme, 72 horas após a injeção do antígeno de Montenegro (Figura) Em lâmina de histopatologia de um dos cães verificou-se formas amastigotas de *L. (V) braziliensis*

Nos testes de IDRM realizados por Costa Val (1994) em 30 cães experimentalmente inoculados com *L. (V) braziliensis*, as leituras foram de diâmetro superior a 5mm, considerando resultados positivos como os de 8 a 20mm. Marzochi & Barbosa-Santos (1988) avaliaram o teste intradérmico em 54 cães em área endêmica de LTA e concluíram que é um teste rápido e sensível para identificação de cães com lesão ativa de LTA. Os resultados encontrados em várias pesquisas

favorecem a utilização do teste de Intradermorreação de Montenegro como método de diagnóstico da leishmaniose canina em estudos epidemiológicos.

#### BIBLIOGRAFIA CITADA:

- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein -dye binding. *Reprod. Res. Lab., Dept. of Biochemistry, University of Georgia, Athens, Ga.*
- Costa Val, A.P. 1994. Leishmaniose Tegumentar Canina: estudo clínico e laboratorial em cães experimentalmente infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 71 p.
- Leon, L.I.; Machado, G.M.C.; Barral, A.; Carvalho- Paes, L.E.; Grimaldi, G.Jr. 1992. Antigenic differences among *Leishmania amazonensis* isolates and their relationship with distinct clinical forms of the disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v 87 (2): 229-234 .
- Madeira, M.F.; Schubach, A.O.; Schubach, T.M.; Serra, C.M.; Pereira, S.A.; Figueiredo, F.B.; Confort, E.M.; Quintella, L.P.; Marzochi, M.C. 2003. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? *Parasitol. Res.* 97(1):73-76.
- Marzochi, M.C.A.; Barbosa-Santos, E.G.O. 1988. Evaluation of a skin test on the canine mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 83 (3): 391-392.
- Tafuri, L. W. 1992. Histopatologia da Intradermorreação de Montenegro no cão em várias condições experimentais: cinética da reação e estudo comparativo com os antígenos Leishvacin e P10.000G. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerias. 146 p.
- Talhari, S.; Arias, J. A.unhas, M.G.S.; Naiff, R.D.; Naiff, M.F.; Freitas, R.A. & Barrett, T., 1988. Leishmaniose no Estado do Amazonas- Aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. *An. Bras. Dermatol.*, 63 (6): 433-438

Recebido em 09/01/2008

Aceito em 26/03/2008

