

**Estudo preliminar sobre a reação
intradérmica com antígeno de
Paracoccidioides brasiliensis em cães
imunizados com *Leishmania amazonensis***

**Skin test with *Paracoccidioides
brasiliensis* antigen in dogs immunized
with *Leishmania amazonensis*: a
preliminary study**

*Eliana Suemi Shinobara¹, Renato César Eisele¹, Ivete Conchon Costa¹,
Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense²,
Eiko Nakagawa Itano¹, Mario Augusto Ono¹*

Resumo

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma das mais prevalentes micoses sistêmicas na América Latina. A PCM é uma doença granulomatosa crônica que acomete principalmente os pulmões, baço, fígado, pele e linfonodos. A maioria dos pacientes com PCM são trabalhadores rurais, do sexo masculino. A suscetibilidade de outras espécies de animais ao desenvolvimento da doença, exceto o tatu, não está bem esclarecida. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que cães são infectados frequentemente por *P. brasiliensis* em áreas endêmicas para PCM. A reação intradérmica com gp43 pode ser utilizada em estudos epidemiológicos para avaliação de infecção de cães por *P. brasiliensis*. Considerando que as áreas endêmicas para PCM também há ocorrência de leishmaniose, este estudo teve como objetivo avaliar a reatividade ao antígeno gp43 em cães imunizados com *Leishmania amazonensis*. Foram imunizados dois cães com *L. amazonensis* inativada e posteriormente foram realizadas reações intradérmicas, utilizando como antígenos gp43 e suspensão de *L. amazonensis* inativada. Os dois cães apresentaram reação intradérmica positiva apenas para *L. amazonensis*.

¹ Depto. de Ciências Patológicas,

² Depto. de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina

O exame histopatológico das reações intradérmicas demonstrou intenso infiltrado inflamatório apenas para *L. amazonensis*. Estes dados sugerem que cães sensibilizados por antígenos de *Leishmania* não reagem cruzadamente com gp43 de *P. brasiliensis*.

Palavras-chaves: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Leishmania amazonensis*, cão, reação intradérmica, hipersensibilidade tardia

Abstract

The fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a prevalent systemic mycosis in Latin America. PCM is a chronic granulomatous disease that affects mainly lungs, spleen, liver, skin and lymph nodes. Male agricultural workers are the most affected by PCM. The susceptibility of other animal species to PCM development, with exception of armadillos, is not well established. Epidemiological studies have shown that dogs are frequently infected by *P. brasiliensis* in PCM endemic areas. Skin test with gp43 may be used to evaluate infection by *P. brasiliensis* in dogs. Taking into account that endemic areas for PCM are also endemic for leishmaniasis, the aim of this study was to evaluate the reactivity to gp43 in dogs immunized with *Leishmania amazonensis*. Two dogs were immunized with inactivated *L. amazonensis* followed by skin tests using gp43 and inactivated *L. amazonensis* as antigens. Both animals showed positivity only to *L. amazonensis*. Histopathological analysis from skin tests showed intense inflammatory infiltrates only in the samples from *L. amazonensis*. These data suggest that dogs sensitized by *L. amazonensis* antigen don't cross react with gp43 from *P. brasiliensis*.

Key words:

INTRODUÇÃO

A paracoccidiomicose (PCM) é uma micose sistêmica, freqüentemente diagnosticada da América Latina, com exceção da Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Chile e Nicarágua ⁽¹⁾. O Brasil é o país que apresenta o maior número de casos de PCM, com maior prevalência nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste ⁽¹⁾.

O agente etiológico da PCM, *Paracoccidioides brasiliensis*, apresenta dimorfismo termo-dependente crescendo na forma

de micélio à 25°C e na forma de levedura à 37°C ^(1,2). Na fase micelial, o fungo cresce em meio de cultura à temperatura ambiente como colônias brancas, de aspecto cotonoso, com hifas aéreas muito curtas apresentando filamentos micelianos finos, septados, com esporos terminais ou intercalares. Na forma de levedura, o fungo cresce *in vitro* à 37°C como colônias cerebriformes, de aspecto cremoso, compostas por células ovais ou alongadas, de diferentes tamanhos (4 a 30 µm), com dupla parede refringente ⁽³⁾.

A infecção ocorre pela inalação de propágulos do fungo, produzindo um foco primário no pulmão, podendo posteriormente disseminar para outros órgãos por via linfática e/ou hematogênica ⁽¹⁾.

A PCM pode ser diagnosticada por exames anatomopatológicos, imunológicos ou micológicos, que apresentam grande importância no estabelecimento do diagnóstico diferencial, tratamento e prognóstico.

Estudos realizados por Negroni na Argentina ⁽⁴⁾, e Albornoz na Venezuela ⁽⁵⁾, sugerem que o habitat de *P. brasiliensis* é o solo.

Há poucos relatos na literatura de paracoccidioidomicose natural em animais. O fungo foi isolado de tatus (*Dasytus novemcinctus*), morcegos (*Artibeus lituratus*) e cão (*Canis familiaris*) ^(6,7,8). Os estudos de Bagagli et al. ⁽⁹⁾ confirmaram que o tatu é um reservatório natural de *P. brasiliensis* e um hospedeiro silvestre do fungo.

Partindo do pressuposto de que o habitat do fungo é o solo, o cão, devido ao hábito de escavar e farejar o solo poderia infectar-se facilmente com o *P. brasiliensis*.

Pereira e Viana em 1991 realizaram a primeira infecção experimental em cão ao inocularem sangue de um paciente com PCM na cavidade peritoneal de um cão, que morreu após 22 dias com peritonite e granulações brancas no peritônio com sinais clínicos de PCM ⁽¹⁰⁾.

Mós e colaboradores ⁽¹¹⁾, por outro lado não conseguiram provocar PCM em cães inoculados com suspensão da forma L de *P. brasiliensis*. Quatorze cães foram inoculados com a forma L de amostra de *P. brasiliensis*; todos apresentaram-se positivos pela reação de fixação de complemento, porém não foi observado PCM em nenhum dos animais.

Ono e colaboradores ⁽¹²⁾ realizaram um estudo epidemiológico em cães da região do Norte do Paraná para a detecção de anticorpos anti-gp43 em ensaio de ELISA, e observaram uma positividade de 89,5% de cães da área rural e 48,8% da periferia.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, que acomete pele e mucosas, caracterizada pela presença de lesões ulcerosas indolores, únicas ou múltiplas (forma cutânea simples), lesões nodulares (forma difusa) ou lesões cutaneomucosas que afetam regiões nasofaríngeas, concomitante ou após um infecção cutânea inicial ⁽¹³⁾.

O agente etiológico é um protozoário do gênero *Leishmania*, que são parasitas intracelulares obrigatórios pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, que alternam seu ciclo evolutivo entre um hospedeiro invertebrado, representado pelos insetos dípteros da subfamília *Phlebotominae* (gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*), e vários hospedeiros vertebrados, inclusive humanos ⁽¹⁴⁾. O cão é considerado um reservatório importante na manutenção da doença no homem, pois são animais de íntimo contato das pessoas, de fácil exposição ao vetor e uma grande fonte de alimento para o inseto ⁽¹⁵⁾.

O parasita apresenta-se sob três formas: amastigota, promastigota e paramastigota. Todas as espécies da *Leishmania* são morfológicamente semelhantes. A reprodução é feita por divisão binária das formas promastigotas no trato digestivo do vetor e das formas amastigotas no interior dos fagossomos de macrófagos do hospedeiro ⁽¹⁶⁾.

Com relação a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, raramente a infecção atinge humanos, pois é uma zoonose de pequenos roedores silvestres. Porém, quando o faz, este parasita está associado à leishmaniose cutânea localizada e cutânea difusa. A primeira é constituída por pápulas ou úlceras simples, geralmente únicas, localizadas nos membros inferiores. A segunda, em indivíduos anérgicos, é representada por nódulos numerosos, intensamente parasitados e espalhados pela pele ^(17, 18). A baixa incidência de casos humanos ocorre provavelmente devido ao fato de seu vetor, a *Lutzomyia flaviscutellata*, Ter atividade noturna e ser pouco antropofílico ⁽¹⁷⁾, estando restrita à caçadores e pescadores que penetram nas florestas à noite ⁽¹³⁾.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que no ano de 1988 a Leishmaniose Tegumentar Americana ultrapassou 12 milhões de casos, com uma incidência anual prevista de 400 mil casos, sendo esta a Sexta doença infecto-parasitária de maior importância entre as que ocorrem no mundo ⁽¹⁹⁾. Contudo, a prevalência mundial das diferentes formas de leishmaniose é desconhecida ⁽¹³⁾. Considerando que as áreas endêmicas para PCM também há ocorrência de leishmaniose, este estudo teve como objetivo avaliar a reatividade ao antígeno gp43 em cães imunizados com *Leishmania amazonensis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolado de *P. brasiliensis*

O isolado de *P. brasiliensis* LDR1, obtido de escarro de paciente com PCM crônica foi cultivado em ágar Sabouraud-peptona-glucose por 7 dias à 35°C. em seguida, as células na forma de levedura foram coletadas, homogeneizadas em salina estéril e a concentração ajustada para 1×10^7 células/ml.

Antígenos

Antígeno gp43

O antígeno gp43 foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, e foi obtido a partir do exoantígeno, usando uma coluna de imunoafinidade Affi-gel10 (Bio Rad, Hércules, CA, USA) ligado com anticorpo monoclonal anti-gp43. O antígeno foi eluído com 0,1M de ácido cítrico, pH 2,8 seguido de neutralização com Tris 1M pH 9,0 segundo Saraiva et al. (1996). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford.

Antígeno de Leishmania

O isolado de *L. amazonensis* (MHOM/BR173/M2269, Ribeirão Preto) foi cultivado em meio bifásico contendo a fase sólida *Blood Agar Base* (BAB) e o meio líquido *Liver Infusion Tryptone* (LIT), à 22°C. O sobrenadante do meio com *Leishmania* foi coletado e submetido à centrifugação (3000 rpm) por 5 minutos. O sedimento foi lavado com PBS a 4°C, inativado com formalina a 0,1%, resuspenso em 10 ml de PBS. A concentração final obtida foi ajustada para 8×10^7 células/ml.

Animais experimentais

Foram utilizados dois cães machos, sem raça definida. Os cães foram acompanhados desde o nascimento e mantidos isolados no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas/UEL, com água e ração comercial *ad libitum*. Os cães foram previamente desverminados (Drontal Puppy®, Bayer, Brasil), tratados contra pulgas e carrapatos (Frontline spray®, Merial, Toulouse, França), e vacinados contra bronquite e hepatite infecciosa, adenovirose, cinomose, coronavirose, leptospirose, parainfluenza e parvovirose (Vanguarda® HTLP 5/CV-L, Pfizer Saúde Animal, USA).

Imunização dos cães com antígeno de *L. amazonensis*

Dois cães machos de cinco meses de idade, não sensibilizados por *P. brasiliensis*, foram imunizados com 3 doses consecutivas, a cada 7 dias, com 1 ml de emulsão do isolado inativado de *L. amazonensis* em adjuvante incompleto de Freund, por via subcutânea. Amostras de sangue foram coletadas imediatamente antes da aplicação do imunógeno e nas semanas subseqüentes à imunização.

Reação intradérmica

Os cães previamente imunizados com *Leishmania* foram submetidos à reação intradérmica com 0,1 ml de antígeno gp43 e com suspensão de *L. amazonensis* inativada (1×10^7 células/ml) na região abdominal.

O diâmetro de induração foi medido após 24 horas, por meio de marcação com caneta esferográfica das bordas de induração. Diâmetros maiores que 5 mm foram considerados positivos. Como controle negativo da reação intradérmica foi usado salina estéril (0,1 ml).

Análise Histopatológica

Foram coletadas biopsias das reações intradérmicas, com um "punch" de 5 mm de diâmetro de corte, após assepsia e anestesia (lidocaína 2%) do local da reação.

O material foi fixado em formalina tamponada 10%, incluído em parafina, e os cortes histológicos foram corados pelo método H.E.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O provável habitat de *P. brasiliensis* é o solo, conseqüentemente o hábito de farejar e escavar o solo pode

favorecer a infecção de cães pelo fungo. Portanto, o cão pode ser um indicador sensível da distribuição do *P. brasiliensis* na natureza ⁽¹²⁾. A reação intradérmica é um método simples e bastante útil para o estudo da epidemiologia da PCM tanto em humanos como em cães.

O relato recente, do primeiro caso de paracoccidiodomicose em cães ⁽²⁰⁾ confirma os estudos anteriores que apontavam para uma possível participação do cão na eco-epidemiologia da paracoccidiodomicose ^(10, 11, 12).

Considerando que há uma sobreposição entre as áreas endêmicas para leishmaniose e paracoccidiodomicose, este estudo teve como objetivo avaliar a possível reatividade cruzada na reação intradérmica.

Os dois cães apresentaram reações positivas para *Leishmania*, mostrando uma região bem definida de induração e eritema, com 5 e 10 mm de diâmetro (tabela 1). Porém nenhum dos cães apresentou reação intradérmica positiva para o antígeno gp43 de *P. brasiliensis* (tabela 1).

Tabela 1. Reação intradérmica com antígeno gp43 de *P. brasiliensis* e suspensão de *Leishmania amazonensis*.

| CÃO | antígeno | diâmetro (mm) |
|-----|-----------------------|---------------|
| 1 | <i>L. amazonensis</i> | 5,0 |
| | gp43 | negativo |
| 2 | <i>L. amazonensis</i> | 10 |
| | gp43 | negativo |

O exame histopatológico dos testes intradérmicas demonstrou um intenso infiltrado inflamatório apenas nas reações ao antígeno de *L. amazonensis* (Figura 1a), enquanto que nas reações à gp43 foram observadas algumas células inflamatórias (Figura 1b).

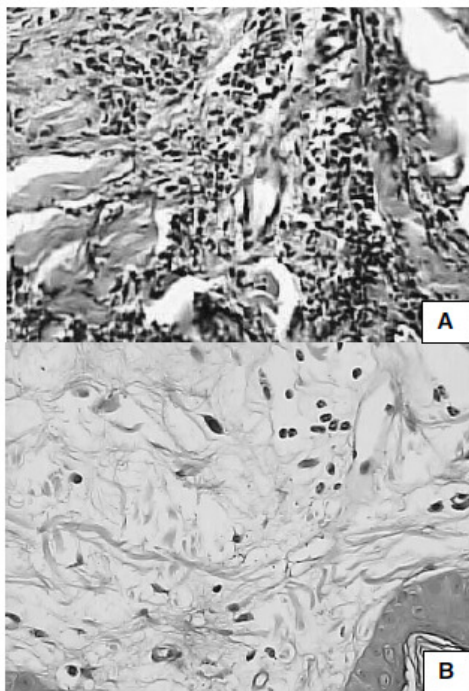


Figura 1. Exame histopatológico de reação intradérmica para antígeno de *Leishmania* (A) e para gp43 (B) em cão imunizado com *L. amazonensis*. (aumento de 400x)

A reação intradérmica positiva nos dois cães com a suspensão de *Leishmania* indica que os cães foram imunizados e desenvolveram resposta celular contra antígenos do protozoário, observada tanto macroscopicamente como pelo exame histopatológico das reações.

A discreta reação inflamatória observada nas reações com gp43 provavelmente seja decorrente de uma reação inflamatória inespecífica à injúria mecânica causada pela inoculação.

Saraiva e colaboradores ⁽²¹⁾ utilizaram com sucesso, a gp43 em reações intradérmicas tanto em modelo experimental como em pacientes com paracoccidiodomicose. Neste mesmo estudo os autores demonstraram a superioridade da gp43 quando comparada com a paracoccidiodina de Fava-Netto, o antígeno tradicionalmente utilizado em estudos epidemiológicos de paracoccidiodomicose. A natureza polissacarídica do antígeno de Fava-Netto é responsável pelas reações cruzadas tanto em ensaios sorológicos para diagnóstico da paracoccidiodomicose como em reações intradérmicas, para estudos epidemiológicos. A utilização de um antígeno purificado, com concentração conhecida, como a gp43 representa um avanço significativo nos estudos relacionados à paracoccidiodomicose.

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que cães sensibilizados por antígenos de *Leishmania* não reagem cruzadamente com gp43 de *P. brasiliensis*, reforçando a sua especificidade para estudos epidemiológicos de paracoccidiodomicose em cães.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin. Microbiol. Rev., 6:89-117, 1993.
2. Almeida SR, Unterkircher CS, Camargo ZP. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. Med. Mycol., 36: 405-11, 1998.
3. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Paracoccidioidomicose. In: Micologia médica. 8 ed. Sarvier editora, São Paulo, p.248-61, 1991.
4. Negroni P. The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina. Prensa Med Argent., 53:2381-2382, 1966
5. Albomoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. Sabouraudia; 2:248-251, 1971.
6. Naiff RD, Ferreira LCL, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 28:19-27, 1986.
7. Grose E, Tamsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. Sabouraudia, 4:124-125, 1965.
8. Bosco SMG, Theodoro RC, Macoris SAG, Farias MR, Muro M, Ribeiro MG, Bagagli E. Morphological and molecular characterization of the first isolate of *Paracoccidioides brasiliensis* from dog (*Canis familiaris*). Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 47 suppl.14, 62-63, 2005.
9. Bagagli E, Sano A, Coelho KL et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. Am.J. Trop. Med. Hyg.; 58:505-512, 1998.
10. Pereira M, Viana G. A propósito de um caso de blastomicose (*Pyobemia blastomycotica*). Arq. Bras. Med., 1:63-83, 1911.
11. Mós EN, Fava Netto C. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose I – possível papel epidemiológico dos cães. Estudo sorológico e anátomo-patológico. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 16:15-9, 1974.

12. Ono MA, Bracarense APFRL, Morais SM, Trapp SM, Belitardo DR, Camargo ZP. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med. Mycol.*, 39:277-82, 2001.
13. Genaro O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D.P. *Parasitologia Humana*. 9.ed. Editora Atheneu, São Paulo, p.36-55, 1998.
14. Wright EP, EL Amin ERM. Leishmania infection: surfaces and immunity. *Biochem. Cell. Biol.*, 67:525-36, 1989.
15. Neto LCF, Souza JC, Rodrigues, MC. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet. Parasitol.*, 79:213-20, 1998.
16. Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exper. Derm.*, 25:363-70, 2000.
17. Marzochi MCA, Schubach AO, Marzochi KBF. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: *Parasitologia humana e seus fundamentos gerais*. Editora Atheneu, São Paulo, p.39-64, 1999.
18. Choi CM, Lerner EA. Leishmaniasis as an emerging infection. *JID Symp. Proc.*, 6:175-82, 2001.
19. Lacerda MM. The Brazilian leishmaniasis control program. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 89:489-98, 1994.
20. Ricci G, Silva IDCCG, Mota FT, Wakamatsu A, Franco MF. Canine paracoccidioidomycosis: report on the first case of the literature. Annual review of Biological Sciences – VIII Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomycose, Pirinópolis-GO, 2002.
21. Saraiva ECO, Altemani A, Franco MF, Unterkircher CS. *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used as paracoccidioidin. *J. Med. Vet. Mycol.*, 34:155-61, 1996

