

ESTUDO DA INFECTIVIDADE E DOS EFEITOS ADVERSOS DA REAÇÃO DE MONTENEGRO COM ANTÍGENO DE *Leishmania amazonensis* INOCULADO EM CAMUNDONGOS *Mus musculus* C57BL/6 SADIOS

Agatha Christie Bruschi Birriel Mariani¹, Maxwell Miguel Barbosa Cordeiro Toledo², Daniel Holanda Barroso³,
Ciro Martins Gomes³, Jaime Martins Santana⁴, Verônica Maria Gonçalves Furtado⁵, Gustavo Henrique Soares
Takano⁵, Carla Nunes de Araújo⁶, Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio⁷

1. Autora principal e estudante da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (FM-UNB)
2. Estudante da graduação de Medicina da FM-UNB
3. Pesquisador de Pós-graduação em Ciências Médicas da FM-UNB
4. Pesquisador do Departamento de Biologia Celular da UNB
5. Pesquisador do Departamento de Patologia da UNB
6. Pesquisadora do Laboratório de Dermatocologia da UNB
7. Orientadora e pesquisadora de Pós-graduação em Ciências Médicas da FM-UNB

Resumo

A Intradermorreação de Montenegro é um recurso diagnóstico prático, barato e com alto percentual de positividade na Leishmaniose Tegumentar Americana, porém devido a dificuldades na produção do antígeno, seu uso tem sido descontinuado no Brasil. Este trabalho propõe o estudo de um novo antígeno em fase pré-clínica para avaliar sua segurança, testar a infectividade, os efeitos adversos e a resposta imunológica. Foram utilizados 30 camundongos *Mus musculus* C57BL/6 sadios, divididos em um grupo controle e quatro grupos com inoculação de diferentes concentrações do antígeno de *Leishmania amazonensis* PH8 (ALA). Foi realizada análise desinstrumentada da lesão, exames bioquímicos, culturas da *Leishmania*, estudo histopatológico e PCR. O ALA foi capaz de despertar resposta imunológica celular nos camundongos mesmo em concentrações mais baixas, mostrando infiltrado celular no exame histopatológico, e pareceu não exercer potencial tóxico nas funções renal e hepática, nem causar reações alérgicas.

Apoio financeiro: CNPq, FUNDADERM, NAP-Sabin.

Trabalho selecionado para a JNIC: ProIC da Universidade de Brasília (UnB)

Autorização legal: Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UnB, protocolo n.º 52/2019.

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar Americana; Diagnóstico; Hipersensibilidade Tardia.

Introdução

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença parasitária endêmica e representa um problema de saúde pública em todos os estados brasileiros¹, cuja incidência tem aumentado nos últimos anos devido à expansão urbana². Seu diagnóstico precoce é essencial para o tratamento, controle e redução da morbidade relacionada à doença e para evitar tratamento farmacológico de falsos positivos, devido ao perfil tóxico das drogas disponíveis.³ Atualmente, o diagnóstico da doença não dispõe de padrão-ouro definido, visto que a visualização dos parasitas nem sempre é possível, por sua escassez nas lesões.³ Desse modo, além da avaliação clínica dermatológica, o reconhecimento da LTA passa pelo auxílio de técnicas complementares, divididas em testes imunológicos, parasitológicos e moleculares, cujo uso isolado pode apresentar limitações na sensibilidade e especificidade, sendo sua associação frequente para o diagnóstico correto.^{3,4,5}

A intradermorreação de Montenegro (IDRM) é um exame imunológico de alta sensibilidade para a LTA e consiste em uma excelente ferramenta diagnóstica auxiliar⁶, usada desde 1920⁷, por ser uma opção prática e barata, que apresenta vantagens operacionais em áreas endêmicas nas quais a infraestrutura é deficiente, além de auxiliar em casos com baixa carga parasitária e lesões recentes⁴, e em situações nas quais um resultado falso negativo poderia causar danos ao paciente.³

Recentemente, o uso da IDRM tem sido descontinuado em território nacional por dificuldades na produção do antígeno em larga escala^{8,9}, justificada por incertezas de sua segurança em humanos, visto que a IDRM é realizada por meio da aplicação do antígeno da *Leishmania amazonensis* (ALA) na pele dos pacientes. Devido a isso, centros de diagnóstico enfrentam dificuldades para utilização desta técnica.

Nesse contexto, o atual trabalho de pesquisa objetiva testar a segurança (infectividade e efeitos adversos) e a resposta imunológica de um novo antígeno modificado de *Leishmania amazonensis* em fase pré-clínica, em modelos animais de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 sadios, através da análise bioquímica, cultura da *Leishmania*, estudo histopatológico e técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), para posterior uso seguro em humanos, visando adotar novas técnicas de produção.

Metodologia

Estudo pré-clínico com modelo animal experimental *in vivo* realizado no biotério e centro de cirurgia experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (FM-UnB). Foram utilizados 30 camundongos isogênicos, fêmeas, espécie *Mus musculus*, linhagem C57BL/6, com aproximadamente 27g e 120 dias, provenientes do CEMIB-UNICAMP, escolhidos por apresentarem suscetibilidade à infecção para diferentes espécies de *Leishmania* e desenvolverem lesões cutâneas, bem como disseminarem para órgãos como fígado, baço e linfonodos, sendo híbridos com uniformidade genética, permitindo respostas semelhantes entre os animais.¹⁰ Os camundongos foram divididos em grupos de A a E, sendo um grupo controle (inoculado com 0,1 ml de solução salina estéril 0,9%) e 4 grupos inoculados com 0,1 ml do antígeno de *Leishmania amazonensis* (ALA) PH8 nas respectivas diluições de 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000.

Foi realizado o preparo do ALA pelo Instituto de Biologia da UnB (IB-UnB) e, quando os animais completaram 150 dias de vida, foi realizada a epilação do local de inoculação com creme depilatório humano da marca Veet® e injetado o ALA nos camundongos. O local de aplicação do ALA foi padronizado na pele do dorso dos animais ao longo da linha média e 1-2 cm proximal à inserção da cauda. Com 48h, foi realizada a observação do local para verificar a presença de lesões cutâneas.

Após 56 dias da aplicação do antígeno nos camundongos, foi realizada anestesia e punção cardíaca para coleta do sangue para os exames bioquímicos e foi realizado o aspirado da linfa da região aonde foi inoculado o antígeno para confecção dos meios de cultura. Em seguida, se procedeu ao sacrifício dos animais com o auxílio do veterinário do biotério da UnB, seguindo os preceitos de ética animal. Foi também realizada a coleta de material para o exame histopatológico do local da inoculação do ALA e para a reação em cadeia de polimerase (PCR).

O material para exame histopatológico foi preservado em formol e foram confeccionadas 30 lâminas, coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E), e a leitura foi realizada de forma cega por 2 patologistas. A PCR também foi realizada utilizando os fragmentos de pele coletados, seguindo a padronização proposta pelo guia da PureLink® Genomic DNA Kits.

Os exames bioquímicos foram realizados através Laboratório Sabin de Brasília, com incentivo do Núcleo de Apoio à Pesquisa, procedendo à dosagem de marcadores de função renal (ureia e creatinina) e marcadores de função hepática (TGO e TGP, fosfatase alcalina, gama-GT, bilirrubinas totais e frações e albumina). Os resultados foram plotados em tabelas e gráficos, para cálculo da média e desvio-padrão e comparação com os valores de referência da literatura.

Foi realizada cultura do aspirado da linfa do local de aplicação do antígeno, utilizando-se seringa de 1 ml com solução salina, sendo o aspirado cultivado em meio McNeal, Novy e Nicolle (NNN), realizado um meio de cultura para cada animal, totalizando 30 meios de cultura separados.

Resultados e Discussão

A observação desinstrumentada da região de aplicação do ALA na pele dos camundongos após 48 horas da inoculação não evidenciou a presença de sinais como eritema, infiltração e pápulas, portanto sem sinais clínicos compatíveis com a infecção pelo antígeno de *Leishmania amazonensis* ou reações alérgicas na região de aplicação na pele dos camundongos.

Os resultados dos exames bioquímicos realizados foram plotados em gráficos e tabelas, com avaliação dos valores médios e desvio-padrão obtidos no trabalho em comparação com os valores de referência registrados na literatura para camundongos da mesma espécie^{11,12}. A análise dos valores permitiu verificar que parece não ter havido alteração significativa nos marcadores bioquímicos na comparação entre os grupos controles e os grupos em que foi feita a aplicação do ALA em diferentes concentrações, ficando dentro dos valores de referência e mostrando assim que o antígeno não parece ter exercido potencial tóxico sobre os órgãos estudados (fígado e rins).

Na avaliação parasitológica realizada pela leitura das culturas de aspirado das lesões, 30 dias após o semeio, não foi evidenciado crescimento de *Leishmanias* em nenhum dos 30 meios de cultura semeados, assim como todas as pesquisas de DNA por PCR foram negativas.

Ao exame histopatológico, a presença de reação imunológica positiva nos camundongos foi evidenciada pela presença de moderado infiltrado inflamatório linfo-histiocítico, permeado por raros polimorfonucleares e acompanhado por edema. A análise histopatológica de 29 camundongos não demonstrou presença de parasitas nem formação de granulomas. Entretanto, um animal que recebeu o antígeno na diluição 1:10, ao exame histopatológico, apresentou *Leishmanias* na forma amastigota, apesar de não ter havido multiplicação de promastigotas no meio de cultura do respectivo animal. Esse resultado indica a necessidade de revisão do protocolo de preparação do antígeno para aplicações posteriores.

Recentemente, um considerável investimento tem sido aplicado em exames de biologia molecular como a PCR, que parecem agregar melhor sensibilidade e especificidade, mas cuja acurácia diagnóstica não atinge a totalidade, com custos elevados³ e resultados de positividade diagnóstica percentualmente semelhantes aos da IDRM, demonstrando que a técnica criada por Montenegro é uma excelente ferramenta diagnóstica auxiliar.⁶

A LTA, em sua forma localizada, é conhecida por induzir intensa resposta celular imune, com formação de granuloma, e essa reação imunológica pode reduzir a quantidade de parasitas na lesão e reduzir a sensibilidade dos testes parasitológicos, mas pode ser insuficiente para curar a doença. Nesse sentido, a associação de outras técnicas, como a IDRM, se torna necessária, contribuindo para um diagnóstico laboratorial mais efetivo da LTA.^{5,13}

Conclusões

Apesar de o teste de hipersensibilidade tardia utilizando o ALA preconizado por Montenegro ser um importante método para diagnóstico da LTA e ser amplamente empregado em estudos epidemiológicos para a identificação de indivíduos expostos e sem doença e indivíduos curados de infecção causada pela *Leishmania*, a IDRm não é padronizada e vários preparados antigênicos em diferentes doses são descritos.^{14,15} Isso leva à necessidade de maiores estudos para a padronização de um antígeno e das respostas obtidas, para que futuramente possa ser estabelecido um protocolo padrão-ouro de diagnóstico da LTA, utilizando a IDRm como método complementar a outros exames como a PCR que, apesar da alta sensibilidade, ainda são caros e exigem infraestrutura complexa. Essa estratégia pode ser de grande valia por aumentar a sensibilidade diagnóstica e melhorar a performance em situações de rastreamento da doença.^{16,17}

O presente estudo se propôs a estudar a infectividade e a segurança do ALA produzido pelo Instituto de Biologia da Universidade de Brasília e averiguar a ocorrência de efeitos adversos na sua aplicação, sendo estudado no atual trabalho em uma abordagem pré-clínica em modelos animais, para que futuramente seja possível prosseguir os estudos até os humanos, visando adotar novas técnicas de produção. Nesse sentido, o antígeno modificado testado em fase pré-clínica foi capaz de despertar resposta imunológica celular nos camundongos mesmo nas concentrações mais baixas, o que é fundamental para a positividade do diagnóstico através do teste intradérmico, e pareceu não exercer potencial tóxico sobre os animais nem causar reações alérgicas na região de aplicação, com segurança em relação às funções renal e hepática, segundo a dosagem dos marcadores bioquímicos. Tendo em vista que um dos animais inoculados com o ALA apresentou amastigotas do protozoário ao exame histopatológico, o protocolo de preparação do antígeno deverá ser reavaliado e novos testes deverão ser realizados.

A IDRm é um método que apresenta notável facilidade de execução, alta sensibilidade para a LTA e baixo custo, fatores que permitiram sua ampla difusão e garantiram que se estabelecesse como o principal exame de rotina, no Brasil e no mundo, para a detecção da LTA.¹⁷ Sua utilização depende da capacitação técnica dos profissionais de saúde em detrimento do uso de infraestrutura mais simples e com menor custo operacional, o que reforça a necessidade de treinamento adequado dos profissionais da saúde e a adequação dos laboratórios públicos e privados para a realização desses exames, ainda mais necessários em áreas endêmicas nas quais a falta de suporte financeiro, infraestrutura e capacitação médica são os principais obstáculos dessa realidade.^{5,12}

Referências bibliográficas

1. ALVAR, Jorge et al. WHO Leishmaniasis Control Team. **Leishmaniasis world wide and global estimates of its incidence.** PLoS One, p. 35671, 7 (5), 2012.
2. BENÍCIO, Ednelza et al. **Sustained Presence of Cutaneous Leishmaniasis in Urban Manaus, the Largest Human Settlement in the Amazon.** *Am J Trop Med Hyg.* 93(6):1208-1213, 2015.
3. GOMES, Ciro Martins et al. **Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis.** *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 89(5), 701-709, 2014.
4. RODRÍGUEZ-CORTÉS, Alhelí et al. **Leishmania infection: laboratory diagnosing in the absence of a “Gold Standard”.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 82, pp. 251-256, 2010.
5. ESPIR, Thais Tibery et al. **Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon.** *Exp Parasitol.* 167:1-6, 2016.
6. TOJAL, Anna Christina et al. **Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil.** *Trop. Med. Int. Health*, 11, pp. 1388-1398, 2006.
7. MONTENEGRO, J. **A cútis-reação na leishmaniose.** *Ann FM-USP*, 1:323-30, 1926.
8. PINHEIRO, Ana Bárbara Sapienza et al. **The accuracy of the Montenegro skin test for leishmaniasis in PCR-negative patients.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2020, vol.53, e20190433.
9. BRAZ, Lucia Maria Almeida. **Tegumentary leishmaniasis diagnosis: what happened with MST (Montenegro Skin Test) in Brazil?.** *Rev. IMTSP*, 61, e17. Epub March 11, 2019.
10. LOEULLIET, Corine et al. **Study of Leishmania pathogenesis in mice: experimental considerations.** *Parasit Vectors.* Mar 11;9:144, 2016.
11. SPINELLI, M. O. et al. **Comparação dos parâmetros bioquímicos de camundongos criados em diferentes condições sanitárias.** *Scientia Plena* Vol. 8, Num. 1, 2012.
12. ALMEIDA, Aline Silva et al. **Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos.** JBPML, Lab. 2008.
13. SILVEIRA, Thais Gomes Verzignassi et al. **Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil.** *Rev. SBMT.*, 32, pp. 413-423, 1999.
14. CUBA, César Augusto Cuba et al. **The use of different concentrations of leishmanial antigen in skin testing to evaluate delayed-hypersensitivity in American cutaneous leishmaniasis.** *Rev SBMT* 18:231-236, 1985.
15. JOSÉ, Fábio Freire et al. **Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro.** *Rev. SBMT*, P. 537-542, Nov-Dez, 2001.
16. SEVILHA-SANTOS, Laís et al. **Accuracy of qPCR for quantifying Leishmania kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis.** *Clin Microbiol Infect.* 25(2):242-7, 2019.
17. GONTIJO, Bernardo et al. **Leishmaniose tegumentar Americana.** *Rev. SBMT*, 36, pp. 71-80, 2003.