

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Utilização da proteína HSP70 na otimização de método diagnóstico imuno-histoquímico para detecção de formas amastigotas de protozoários do gênero *Leishmania*

PEDRO PAULO DE ABREU TELES

BELO HORIZONTE,

2018

PEDRO PAULO DE ABREU TELES

Utilização da proteína HSP70 na otimização de método diagnóstico imuno-histoquímico para detecção de formas amastigotas de protozoários do gênero *Leishmania*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Patologia (Área de Concentração de Patologia Investigativa).

Orientador: Prof Wagner Luiz Tafuri.

Co-orientadora: Profa Héli da Monteiro de Andrade.

BELO HORIZONTE,

2018

T269u Teles, Pedro Paulo de Abreu.
Utilização da proteína HSP70 na otimização de método diagnóstico imuno-histoquímico para detecção de formas amastigotas de protozoários do gênero Leishmania [recursos eletrônicos]. / Pedro Paulo de Abreu Teles. -- Belo Horizonte: 2018.
55f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Wagner Luiz Tafuri.
Coorientador (a): Héli da Monteiro de Andrade.
Área de concentração: Patologia Investigativa.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Imuno-Histoquímica. 2. Proteínas de Choque Térmico HSP70. 3. Diagnóstico. 4. Infecções por Protozoários. 5. Leishmania. 6. Dissertação Acadêmica. I. Tafuri, Wagner Luiz. II. Andrade, Héli da Monteiro de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QU 55.6

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2018.
Profa. Héliida Monteiro de Andrade (Doutora)

PEDRO PAULO DE ABREU TELES

Realizou-se, no dia 26 de fevereiro de 2018, às 09:00 horas, C3-251, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada **Anticorpo anti-HSP70r como alternativa no diagnóstico imuno-histoquímico da leishmaniose visceral canina**, apresentada por **PEDRO PAULO DE ABREU TELES**, número de registro 2016662870, graduado no curso de MEDICINA VETERINÁRIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Wagner Luiz Tafuri - Orientador (UFMG), Profa. Tatiane Alves da Paixão (UFMG), Dra Lucélia de Jesus Pinheiro (UFMG), Profa. Héliida Monteiro de Andrade (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

☒ Aprovada

☐ Reprovada

Prof. Wagner Luiz Tafuri (Doutor)

Profa. Tatiane Alves da Paixão (Doutora)

Dra Lucélia de Jesus Pinheiro (Doutora)

Profa Héliida Monteiro de Andrade (Doutora)

Wagner Luiz Tafuri
Tatiane Alves da Paixão
Lucélia de Jesus Pinheiro
Héliida Monteiro de Andrade

RESUMO

As Leishmanioses correspondem a um espectro clínico de doenças tanto no homem como no cão variando das formas tegumentares localizadas até as formas viscerais (sistêmicas). Entretanto é uma doença de caráter crônico causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) é um dos métodos de diagnóstico baseada na visualização de formas amastigotas de *Leishmania* nos tecidos, Tafuri et. al (2004) descreveram uma técnica alternativa de IHQ utilizando, como anticorpo primário, soro hiperimune de cão naturalmente infectado com *Leishmania infantum*. Essa técnica mostrou-se efetiva na detecção de formas amastigotas de *Leishmania* nos diversos tecidos de cães com leishmaniose visceral e no homem com as diferentes formas de Leishmaniose Tegumentar. Nesse trabalho padronizamos uma outra técnica de IHQ utilizando soro de coelho experimentalmente sensibilizado pelo antígeno HSP70 (antígeno ribossomal de *Leishmania*) como anticorpo primário. O objetivo foi de comparar com a técnica de Tafuri et al. (2004), Cortes histológicos em duplicata foram analisados de acordo com as duas técnicas de IHQ aplicadas. Observou-se uma correlação absoluta na classificação de reatividade das formas amastigotas, tanto quando se utilizou soro hiperimune de cão naturalmente infectado ou soro de coelho sensibilizado com HSP70. Para essa análise semi-quantitativa da reação, foi estabelecido um escore baseado no número de campos com amastigotas imunorreativas: grau 1 (0 – 15 campos), grau 2 (15 a 30 campos) e grau 3 (> que 30 campos). Após análise histológica os resultados foram de vinte cortes histológicos (68,9%) para o grau 1; de um corte histológico (3,5%) para o grau 2 e oito cortes histológicos (27,6%) para o grau 3. Um estudo quantitativo foi realizado por microscopia óptica e análises morfométricas utilizando o sistema KS300 da Zeiss (Carl Zeiss®, Germany). Vinte e cinco imagens foram aleatoriamente capturadas e utilizadas para a contagem de amastigotas imunorreativas. O software Prism 5.0 foi utilizado para a análise dos dados. Não houve diferença estatística entre os testes de IHQ ($P < 0,05$). Portanto os resultados demonstraram que é possível obter imunomarcagem de formas amastigotas de acordo com o teste de IHQ a partir da utilização de soro de coelho sensibilizado com o antígeno HSP70. Melhorias na técnica para a redução de background ainda devem ser realizadas. A utilização da produção de anticorpo primário de coelho pode permitir maior acurácia no processo diagnóstico da IHQ.

Palavras chave: Imuno-histoquímica. HSP70. Diagnóstico.

ABSTRACT

Leishmaniasis corresponds to a group of infectoparasitary diseases caused by protozoa of the *Leishmania* species. Developed by Tafuri, et. al (2004), the alternative technique of Immunohistochemistry (IHQ) which uses hyperimmune serum to *Leishmania infantum* in naturally infected dogs as primary antibody showed to be effective for the detection of amastigote forms of Visceral Leishmaniasis (VL) and American Cutaneous Leishmaniasis (ACL). Three of the most common species in the state of Minas Gerais, *L. infantum*, *L.(V.)amazonensis* and *L.(V.) braziliensis* had the proteomic characterization of their antigens to determine their immunogenic reactivities to the dog hyperimmune serum. In this study we describe the standardization of a new IHQ protocol using rabbit serum sensitized by the antigen HSP70 as primary antibody aiming at the comparison and enhancement of the technique in order to improve the diagnosis in dogs infected by *Leishmania spp.* Duplicate histological sections were analyzed according to the two applied techniques of IHQ. A 100% correlation was obtained in the classification of reative amastigote forms, both when using hyperimmune serum from naturally infected dogs or rabbit serum sensitized by the antigen HSP70. For that semiquantitative analysis of the reaction a score was established based on the number of fields with immunolabeled amastigotes, ranging from 1 (0 -15 fields), 2 (15-30 fields) to 3 (> 30 fields) according to the infection level and the results were: 1) twenty (68,9%) histological sections; 2) one (3,5%) histological sections and 3) eight (27,6%) histological sections. Quantitative study was carried out by optical microscopy and morphometrical analysis. Twenty five images were randomly chosen and used to count immunolabeled amastigotes. The images were analyzed by software, viewed on a computer video screen and sent to a computer-assisted image analysis system KS300 (Carl Zeiss®, Germany). The program Prism 5.0 was used for the analyses. There was no statistical difference between IHQ tests ($P<0,05$). Thereby the results demonstrated that it was possible to obtain the labeling of amastigote forms through this IHQ test made from the rabbit serum sensitized by the antigen HSP70. Improvements in technique for background reduction have yet to be performed. The use of the primary rabbit antibody production could allow for the creation of a better IHQ diagnosis process.

Keywords: Immunohistochemistry. HSP70. Diagnosis.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Número de cortes histológicos e sua respectiva porcentagem em cada escore nas técnicas de IHQ segundo Tafuri et al. (2004) IHQ-HSP70, respectivamente.....	27
---	----

GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Mediana da quantidade de formas amastigotas de <i>L. infantum</i> imunomarcadas através das técnicas de IHQ segundo Tafuri et al. (2004) e IHQ-HSP70.....	33
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Distribuição dos cortes histológicos de acordo com os protocolos (P1, P2 e P3) para a padronização da técnica de IHQ.....	16
FIGURA 2: Esquema ilustrativo da imunização do coelho com rHSP70. Intervalos de 15 dias entre as sensibilizações.....	21
FIGURA 3: Corte histológico de pele de orelha de cão naturalmente infectado por <i>L. infantum</i>	26
FIGURA 4: Cortes histológicos de pele de orelha de cão naturalmente infectado por <i>L. infantum</i> classificados no escore 1.....	28
FIGURA 5: Cortes histológicos de pele de orelha de cão naturalmente infectado por <i>L. infantum</i> classificados no escore 2.....	30
FIGURA 6: Cortes histológicos de pele de orelha de cão naturalmente infectado por <i>L. infantum</i> classificados no escore 3.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

anti-LPG	anti - Lipofosfoglicano
BSA	Albumina sérica bovina
DS	Derme superficial
DP	Derme profunda
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina eosina
IHQ	Imunohistoquímica
IHQ-HSP70	Imunohistoquímica utilizando-se o soro de coelho sensibilizado com HSP70
LC	Leishmaniose cutânea
LDPC	Leishmaniose dérmica pós calazar
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
SFM	Sistema fagocítico mononuclear

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 LEISHMANIA E LEISHMANIOSES.....	02
1.2 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	03
1.2.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)	03
1.2.2 IH2 PARA DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES.....	05
1.3 PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO COMO ANTÍGENO.....	06
2 JUSTIFICATIVA.....	08
3 OBJETIVOS.....	08
3.1 OBJETIVO GERAL.....	10
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
4.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL ANTI-HSP70.....	11
4.1.1 COLETA DE SANGUE.....	11
4.1.2 IMUNIZAÇÃO DO COELHO.....	12
4.1.3 ELISA.....	12
4.2 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IHQ COM SORO SENSIBILIZADO COM HSP70.....	13
4.2.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA CONTENDO FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>L.</i> <i>infantum</i>	13
4.2.2 DILUIÇÃO DO ANTICORPO PRIMÁRIO.....	13
4.2.3 PROTOCOLOS	14
4.2.4 MELHORIAS NA TÉCNICA DE IHQ.....	16
4.2.4.1 Bloqueio em metanol.....	17
4.2.4.2 Bloqueio com soro de cabra.....	17
4.2.4.3 Bloqueio com soro de coelho	18
4.2.4.4 Maiores diluições do anticorpo primário.....	18
4.2.5 CONTROLE NEGATIVO	19
4.3 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE IHQ.....	19
4.3.1 ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA.....	19
4.3.2 ANÁLISE QUANTITATIVA	20
5 RESULTADOS	21
5.1 IMUNIZAÇÃO DO COELHO	21

5.2 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA	22
5.2.1 P1	22
5.2.2 P2	22
5.2.3 P3	23
5.2.4 ESCOLHA DO PROTOCOLO E MELHORIA NA TÉCNICA.....	23
5.2.5 CONTROLE NEGATIVO COM SORO DE COELHO.....	24
5.3 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE IHQ	24
5.3.1 ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA.....	24
5.3.2 ANÁLISE QUANTITATIVA	33
6 DISCUSSÃO.....	34
7 CONCLUSÃO	38
8 PERSPECTIVAS	39
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIA E LEISHMANIOSES

As leishmanioses correspondem a um grupo de doenças infectoparasitárias causadas por parasitos protozoários pertencentes a mais de vinte tipos de espécies do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Possuem grande importância no contexto médico e médico veterinário e são transmitidas ao homem e outros mamíferos através do repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectados, que são seus vetores (DANTAS-TORRES, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; ROSS, 1903).

O parasito possui caráter digenético e possui ciclo de vida intracelular e sua transmissão tem início quando a fêmea do flebotomíneo infectado realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado havendo o depósito na derme de formas promastigotas metacíclicas flageladas infectantes que são posteriormente fagocitadas pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM), especialmente os macrófagos, atraídos devido à reação inflamatória local. No interior dessas células ocorre nova conformação para formas amastigotas desprovidas de flagelo, seguida de divisão binária e subsequente ruptura da célula hospedeira permitindo a infecção de outras células mononucleares presentes no local. A conclusão do ciclo ocorre quando um novo repasto sanguíneo é realizado, permitindo ingestão de formas amastigotas do parasito existentes no citoplasma de células do SFM e em componentes do repasto sanguíneo presentes na derme do hospedeiro infectado. No intestino do hospedeiro invertebrado as formas amastigotas sofrem nova conformação para as formas promastigotas (BATES, 2007; DANTAS-TORRES, 2006; NEUBER, 2008).

Reconhecida como uma das mais negligenciadas doenças tropicais do mundo, acomete atualmente mais de doze milhões de pessoas e estima-se o surgimento de pelo menos dois milhões de novos casos e de 20.000 mortes a cada ano (WORLD HEALTH ASSEMBLY, 2007). É considerada endêmica em 98 países e em três territórios e pelo menos 350 milhões de indivíduos estão sob o risco de infecção (ALVAR et al., 2012; WORLD HEALTH ASSEMBLY, 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2016).

Existem quatro principais manifestações clínicas da doença: Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como Calazar, Leishmaniose Dérmica Pós Calazar (LDPC), Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Muco Cutânea (LMC) (GRAMICCIA; GRADONI, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2016). As formas cutâneas são as de maior incidência ao ponto que a LV é a forma mais grave e quase sempre fatal quando não tratada (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2016). De acordo com o número de casos reportados até 2013, vinte e cinco países se destacaram pelas altas taxas de prevalência da doença, quatorze representando a LV e doze a LC (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2016). O Brasil foi o único país pertencente a ambos os grupos, com ampla distribuição territorial das duas formas da doença, representadas principalmente pelas espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L.(V.) amazonensis* na Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e pela *L.(Leishmania) infantum* na forma visceral (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Nas Américas, o Brasil destaca-se por apresentar 90% dos casos de LV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2016).

Além do homem, vários outros mamíferos (Edentata, Carnivora, Hyracoidea, Rodentia, Primates, Marsupialia, and Peris-sodactyla) são descritos como hospedeiros vertebrados das espécies de *Leishmania spp.* que possui caráter antroponozoonótico ou zoonótico de acordo com reservatório natural do parasito (GRAMICCIA; GRADONI, 2005). Os cães (*Canis familiaris*) são reconhecidos como reservatórios domésticos de LV em áreas urbanas e peri-urbanas, com importância no ciclo epidemiológico evidenciada por relatos de que epidemias nesses animais precedem o surgimento de novos casos humanos em áreas endêmicas (ABBEHUSEN et al., 2017; MAIA-ELKHOURY et al., 2008). Estudos demonstraram a existência de cães naturalmente infectados por *L. (V.) braziliensis* e *L.(V.) amazonensis* destacando a importância desses animais na manutenção da LTA em focos domésticos e peri-domésticos, com possibilidade de co-infecção das formas tegumentares e viscerais (AGUILAR et al., 1989; CASTRO et al., 2007; MADEIRA et al., 2006; REITHINGER et al., 2000; RYAN et al., 2003; TOLEZANO et al., 2007).

1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL

1.2.3 DIAGNÓSTICO

Uma das estratégias do controle epidemiológico atualmente empregadas em regiões endêmicas para Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é o diagnóstico e a detecção de cães naturalmente infectados (Alves et al., 2013; Ministério da Saúde, 2014). A abordagem clinicopatológica completa é necessária e baseia-se em na associação de testes validados, tais como os hematológicos, bioquímicos, imunológicos, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA); moleculares, como a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) e parasitológicos para pesquisa direta de formas amastigotas, como a citologia de aspirados de medula óssea e linfonodos, análise histopatológica de tecidos e Imunohistoquímica (IHQ) (Solano-Gallego et al, 2009; Solano-Gallego et al, 2011). Em especial, destaca-se a IHQ, pois se apresenta como padrão ouro no diagnóstico parasitológico por possuir alta sensibilidade e especificidade na visualização de formas amastigotas de *Leishmania spp.* (LUNEDO et al., 2012).

1.3. IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

A IHQ é um método usado para determinar a expressão de biomarcadores nos tecidos, permitindo a análise diagnóstica em que se utilizam anticorpos como reagentes específicos com o potencial de identificar e estabelecer ligação com constituintes antigênicos presentes em fragmentos de tecidos pela formação dos complexos antígeno-anticorpo. É uma técnica amplamente utilizada na área da anatomia patológica com suas principais aplicações nos estudos de neoplasias, doenças infecciosas e doenças degenerativas (PETERSEN; et al., 2013; TORLAKOVIC et al., 2010).

No processo de execução da técnica, devem-se seguir protocolos rigorosos pré-estabelecidos, de acordo com o tipo de anticorpo utilizado, assim como o tipo do

fragmento de tecido. Essas padronizações devem ocorrer para que o teste de IHQ suceda de maneira eficaz a cada vez em que a técnica for replicada. Para isso alguns critérios devem ser respeitados. Os antígenos devem permanecer insolúveis, disponíveis no fragmento de tecido no decorrer da técnica, preservando suas características que serão reconhecidas pelo anticorpo, assim em alguns casos, faz-se necessária a aplicação métodos de recuperação antigênica. Deve haver marcação específica pelo anticorpo primário (marcação específica) evitando-se a marcação de outros componentes presentes na amostra (marcação inespecífica). Visa-se portanto uma imunomarcação estável, com intensidade suficiente para expressar a presença do antígeno que se deseja avaliar (LIN; CHEN, 2014; TORLAKOVIC et al., 2010). A imunomarcação pode ocorrer através dos métodos diretos e indiretos (FERRO, 2013).

1.3.1. Métodos diretos

Neste método aplica-se somente um anticorpo primário que se liga diretamente ao antígeno. O anticorpo primário possui um marcador que evidencia a reação. É caracterizado por ser menos dispendioso e rápido. Todavia há menor ampliação de sinal do imunocomplexo, uma vez que somente uma molécula de marcador por antígeno é evidenciada (FERRO, 2013; PETERSEN; et al., 2013).

1.3.2. Métodos indiretos

1.3.2.1 *Simples*

Neste método, utiliza-se a associação do anticorpo secundário conjugado com um marcador ao anticorpo primário não conjugado. O anticorpo primário se liga diretamente ao antígeno no fragmento de tecido. Aplica-se o anticorpo secundário que se ligará às imunoglobulinas da espécie animal em que foi produzido o anticorpo primário. No anticorpo secundário desse tipo de reação existe um sinalizador para evidenciar o complexo formado (anticorpo conjugado). É mais sensível do que o método direto, pois há maior número de moléculas de marcador por cada molécula de antígeno, conseqüentemente é mais econômico, entretanto possui tempo de

execução mais prolongado quando comparado ao método direto (FERRO, 2013; PETERSEN; et al., 2013).

1.3.2.1 *Estreptavidina biotina peroxidase*

Essa técnica consiste da incubação do anticorpo primário para que esse se ligue ao antígeno no fragmento de tecido. Posteriormente, incuba-se o anticorpo secundário biotinilado que se ligará às imunoglobulinas da espécie animal em que foi produzido o anticorpo primário, seguida da aplicação da estreptoavidina com substância propiciadora da visualização da reação (HRP). O anticorpo secundário biotinilado em associação com a estreptoavidina, formará o complexo estreptoavidina-biotina. Esse método é bastante sensível e útil para a detecção de pequenas quantidades de antígeno. Como cada anticorpo secundário pode conjugar até 150 moléculas de biotina, ocorre a ligação de vários complexos, justificando sua elevada sensibilidade. A ligação entre a avidina e a biotina ocorre com avidéz devido a ligações químicas não covalentes (FERRO, 2013; PETERSEN; et al., 2013).

1.3.3. IHQ na detecção de formas amastigotas de protozoários do gênero *Leishmania*.

Desenvolvido em nosso grupo de pesquisa por Tafuri, et. al (2004), a técnica alternativa de IHQ (estreptavidina biotina peroxidase) que utiliza soro hiperimune de cão naturalmente infectado por LVC como anticorpo primário mostrou-se eficaz para detecção de formas amastigotas de LV e LTA (ALVES et al., 2013). A utilização do anticorpo policlonal na técnica de IHQ permite a diminuição do custo, praticidade em sua produção e a possibilidade de se trabalhar em altas diluições (ALVES et al., 2013; LIN; CHEN, 2014; RAMOS-VARA, 2002). Na técnica, cortes histológicos são desparafinados em Xilol e hidratados em soluções decrescentes de álcool (Absoluto 1, Absoluto 2, Álcool 90%, Álcool 80%, Álcool 70% e água destilada) para posterior incubação em solução para bloqueio de peroxidase [Peroxido de hidrogênio (H_2O_2)30vv à 4% em 0,01M de PBS pH7,2] seguido de incubação em banho de leite (12g de leite em pó diluído em 200ml PBS) para bloqueio de sítios inespecíficos. Soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *L. infantum* é diluído em PBS BSA 0,1% e utilizado como anticorpo primário. As lâminas são então incubadas em câmara

úmida à 4° de 16 a 18 horas. Após lavagem em PBS (0,01M) as lâminas são incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo secundário (Dako LSAB2 System-HRP). Para a revelação da reação utiliza-se 0,05g de diaminobenzidina (DAB) diluída em 200ml de PBS juntamente ao peróxido de hidrogênio 40vv à 0,16% durante cinco minutos. As lâminas são então contraincoradas com Hematoxilina de Harris e posteriormente desidratadas, diafanizadas e montadas com lamínulas (ALVES et al., 2013; CASTRO et al., 2018; MADEIRA et al., 2016; SILVA et al., 2013; TAFURI et al., 2004).

De acordo com o potencial dessa técnica de IHQ que é menos dispendiosa para o diagnóstico das formas tegumentar e visceral da leishmaniose, buscou-se sua melhor compreensão, através de um estudo proteômico para a identificação dos antígenos reativos em comum dentre as espécies de *Leishmania* que permitem que a técnica funcione em ambas apresentações da doença, (LIMA et al., 2016).

1.3 PROTEÔMICA

A proteômica visa a caracterizar o conjunto de proteínas expressas em um dado momento, fornecendo informação em nível molecular da variabilidade genética que é efetivamente expressa do genoma. A atividade das proteínas está intimamente relacionada à função do gene, uma vez que é o produto final da regulação da atividade gênica, complementando os estudos sobre a biologia molecular das células. Dentre as inovações permitidas pelo estudo das proteômicas, destacam-se a identificação de novos alvos terapêuticos, novas moléculas bioativas, imunógenos de vacinas e especialmente marcadores biológicos que possam ser utilizados para o diagnóstico de doenças (BARBOSA et al., 2012; WILKINS et al., 1996).

Estudos proteômicos com *Leishmania* evidenciaram a possibilidade do uso de sorologia proteômica como uma abordagem no mapeamento da antigenicidade na leishmaniose. Três das espécies mais comuns no estado Minas Gerais, *L. infantum*, *L.(V.)amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* passaram por caracterização proteômica de seus antígenos para determinação de suas reatividades imunogênicas ao soro hiperimune de cão. Com isso, constatou-se que a proteína de choque térmico 70

(HSP70) foi reativa simultaneamente para as três espécies estudadas (COSTA et al., 2011; LIMA et al., 2016). As proteínas de choque térmico representam antígenos proeminentes durante o curso de doenças infecciosas causadas por bactérias, protozoários, fungos e nematódeos. Em especial, as HSP70 são altamente conservadas na escala evolutiva. Sua utilização em estudos de imunização com peptídeos ou oligossacarídeos conjugados com o *Mycobacterium tuberculosis* promove uma forte resposta humoral, mesmo na ausência de adjuvantes (BARRIOS et al., 1992; KAUFMANN, 1990; ZUGEL; KAUFMANN, 1999).

2. JUTIFICATIVA

O diagnóstico das Leishmanioses é de difícil execução, uma vez que não existe nenhum teste com 100% de sensibilidade e especificidade. Dessa forma, visa-se a associação de diversos métodos, como sorológicos, moleculares e parasitológicos, possibilitando o diagnóstico. Dentre todos métodos diagnósticos empregados nas diversas apresentações da doença, a detecção parasitológica fornece o diagnóstico de certeza da infecção, a partir da visualização de formas amastigotas nos tecidos.

Trabalhos prévios demonstraram as relações de sensibilidade e especificidade do diagnóstico parasitológico para a detecção de formas amastigotas de *Leishmania spp.* pela técnica alternativa de IHQ descrita por Tafuri et al. (2004), em fragmentos de pele de cão fixados em formalina e incluídos em parafina. Foi evidenciada correlação positiva entre a IHQ e a reação em cadeia da polimerase (PCR) sem que houvesse diferença estatística entre as técnicas, sendo ainda demonstrada a correlação positiva entre a IHQ e o xenodiagnóstico (AMORIM et al., 2011; XAVIER et al., 2006). Quando testada na LTA, a IHQ segundo Tafuri et al. (2004), demonstrou alta sensibilidade quando comparada com a pesquisa de formas amastigotas utilizando-se a técnica de IHQ com anticorpo monoclonal anti - Lipofosfoglicano (anti-LPG) (ALVES et al., 2013).

Diante do seu alto potencial para o diagnóstico de formas amastigotas de *Leishmania spp.* a técnica alternativa de IHQ segundo Tafuri et al. (2004) apresenta-se como uma boa ferramenta diagnóstica. Foi identificado que utilizando o soro de cão naturalmente infectado com *L. infantum* e extrato protéico das três das espécies mais relevantes no Brasil, *L. infantum*, *L.(V.)amazonensis* e *L.(V.) braziliensis*, que a proteína HSP70 é um antígeno com reatividade compartilhada entre as espécies. Esse achado possibilitou uma maior compreensão da técnica e fornece um apossível justificativa do funcionamento da IHQ tanto na apresentação visceral, como na tegumentar da doença, gerando um potencial de melhoria na técnica, podendo se tornar ainda mais sensível e/ou específica.

A utilização do soro hiperimune de cão como anticorpo primário fez com que a técnica de IHQ se tornasse menos dispendiosa. Entretanto, a necessidade de um cão naturalmente infectado por *L. infantum* para obtenção do soro hiperimune é um fator

que limita sua replicabilidade. Nesse cenário, a utilização de outra espécie, que permita melhor manejo laboratorial “in house”, sensibilizada de forma mais específica para a produção do anticorpo primário poderia ser de grande valor na otimização e viabilidade do teste de IHQ como um kit diagnóstico comercial e amplamente difundido.

Portanto, o que propomos é a otimização da técnica de IHQ segundo Tafuri, et al. (2004), a partir da sensibilização de coelho saudável com a HSP70 para a produção de soro sensibilizado e consequente anticorpo primário para sua utilização na técnica de IHQ. Desta forma, esse trabalho se justifica pela aplicação dos estudos proteômicos em teste diagnóstico parasitológico para detecção de formas amastigotas de *Leishmania infantum* utilizando-se um antígeno mais específico possibilitando maiores sensibilidade e/ou especificidade ao teste.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma nova técnica de IH! Para diagnóstico das leishmanioses.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Produzir soro de coelho sensibilizado à HSP70 recombinante de *Leishmania*
- 2) Padronizar a técnica de IHQ utilizando o soro de coelho sensibilizado à HSP70 como anticorpo primário
- 3) Comparar a técnica de IHQ padronizada com a IHQ segundo Tafuri et al. (2004).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PRODUÇÃO DO ANTICORPO POLICLONAL ANTI-HSP70

O presente trabalho possui aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) de Minas Gerais, protocolo nº 98/2012.

Em parceria com o Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, coordenado pela Professora Hélida Monteiro de Andrade, obteve-se a proteína HSP70 recombinante de *Leishmania* (rHSP70L), purificada e liofilizada que foi utilizada como antígeno para a produção de soro com o anticorpo policlonal anti-HSP70. Para isso, optou-se pelo uso de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), raça Nova Zelândia, que possibilita a produção de até 100ml de soro. Esse soro total funcionará como o anticorpo primário, compatível com o anticorpo secundário utilizado na reação de imuno-histoquímica para diagnóstico de formas amastigotas de *Leishmania*. O animal é caracterizado por ser dócil, favorecendo o manejo e seu manuseio. A escolha do coelho está de acordo com estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa, que preconiza sua utilização a partir de 12 semanas de vida. Obteve-se um coelho, adulto, fêmea, da fazenda experimental Hélio Barbosa/UFMG com 10 semanas de vida que foi alocado no biotério do Departamento de Patologia Geral da UFMG onde passou por quarentena de 15 dias, com dieta restrita a água potável e ração esterilizada.

Um protocolo de três sensibilizações em intervalos de quinze dias foi previamente estabelecido e com o auxílio de dois técnicos treinados, o animal de experimentação (coelho) foi imobilizado em decúbito esternal para sua manipulação.

4.1.1. COLETA DE SANGUE

Antes da sensibilização do animal foi feita antisepsia com álcool 70% da orelha esquerda e coletou-se 3,0 ml de sangue através de punção venosa auricular com o auxílio de uma seringa descartável estéril de 5cc com agulha descartável estéril de calibre 21G1 (0.80 mm x 25 mm) da marca BD®. Após a coleta, o sangue foi armazenado em tubo para coleta de soro e encaminhado para o Laboratório de

Leishmanioses do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG. Após coagulação à 37°C, a amostra foi centrifugada à 10.000rpm durante 10 minutos à 4°C para obtenção do soro e seu posterior congelamento à -20°C.

4.1.2 IMUNIZAÇÃO DO COELHO

No tempo zero (T0) preparou-se a solução com 200µg do antígeno HSP70 (800µg de antígeno liofilizado em 2ml de PBS 0,15 M pH7,4) em 0,5ml somada de 0,5ml do adjuvante completo de Freund da marca Laborclin® (suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* em óleo mineral e um agente emulsionante), totalizando 1,0ml, que foi aplicada por via subcutânea, fracionada em 3 regiões do dorso do animal. A utilização de adjuvantes permite que menores quantidades de antígeno sejam utilizadas, prolongando e intensificando a resposta à produção de anticorpos (FERRO, 2013). Quinze dias após o T0 foi realizada nova coleta sanguínea de 3ml seguida da segunda imunização, diferindo da primeira por utilizar-se 0,5ml de adjuvante incompleto de Freund da marca Laborclin® (similar ao adjuvante completo, sem a adição do *M. tuberculosis*) somada a 0,5ml da solução do antígeno HSP70, totalizando 1,0ml aplicado por via subcutânea, fracionada em 3 regiões do dorso do animal. Quinze dias após o T1 foi realizada nova coleta sanguínea de 3ml seguida da aplicação da terceira imunização – 0,5 ml da solução do antígeno HSP70 com 0,5ml de adjuvante incompleto de Freund, totalizando 1,0ml aplicado por via subcutânea, fracionada em 3 regiões do dorso do animal. Quinze dias após o T2 foi realizada nova coleta sanguínea.

4.1.3 ELISA

No Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG foi realizada titulação de todas as amostras dos soros obtidos em T0, T1, T2 e T3 através da técnica de ELISA por sensibilização das placas com 0,5 µg/mL da rHSP70L dissolvida em Tampão Bicarbonato pH 9,6. Utilizou-se na técnica o conjugado anti-imunoglobulinas de coelho com peroxidase (Life Technologies – número de catálogo A10547). As placas tiveram sua leitura realizada à 492nm em aparelho espectrofotômetro de leitura Multiskan Go (Thermo Scientific).

Após o resultado obtido na titulação foi realizada a coleta do volume de 20ml de sangue, através de punção intracardíaca, o qual foi imediatamente centrifugado para separação do soro que foi congelado à -20,0°C para futura utilização na técnica de IHQ.

4.2 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ) COM SORO SENSIBILIZADO COM HSP70

4.2.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA CONTENDO FORMAS AMASTIGOTAS DE *L. infantum*

Selecionou-se do acervo do Laboratório de Patologia das leishmanioses (LPL) do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), um fragmento de pele de orelha, emblocado em parafina, de cão naturalmente infectado por *L. infantum* com intenso parasitismo por formas amastigotas, (FIGUEIREDO et al., 2010; SILVA et al., 2013) de acordo com resultado prévio de IHQ positiva (amostra positiva). Desse fragmento obtiveram-se 18 cortes de quatro micras, confeccionados a partir de um micrótomo semiautomático (Zeiss modelo CUT5062), em 18 lâminas histológicas gelatinizadas (a gelatina especial é utilizada para fornecer maior aderência aos cortes de fragmento de tecido).

4.2.2 DILUIÇÃO DO ANTICORPO PRIMÁRIO

Determinou-se inicialmente a utilização de quatro diluições do soro de coelho sensibilizado à HSP70 nas seguintes proporções: I) 1:50; II) 1:100; III) 1:200 e IV) 1:400. Para isso, o soro foi previamente descongelado à temperatura ambiente para posterior diluição em solução de 0,01 M de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 com 0,01% de albumina sérica bovina (BSA), conforme as concentrações desejadas.

4.2.3 PROTOCOLOS

Para a padronização da técnica de IHQ utilizando-se o soro de coelho sensibilizado com HSP70 (IHQ-HSP70) foi determinado o uso protocolo da técnica de IHQ segundo Tafuri, et. al. (2004), com modificações, sendo estabelecidos três protocolos distintos. Emprega-se quatro variações das concentrações do soro, em cada, sendo 1:50; 1:100; 1:200 e 1:400, diluídos em PBS BSA 0,1%, além de controle positivo da reação (utilizando-se soro hiperimune de cão como anticorpo primário) e controle negativo da reação (substituindo-se o anticorpo primário por PBS 0,01M).

Protocolo 1 (P1):

No P1, substitui-se o anticorpo primário (soro hiperimune de cão naturalmente infectado por LVC) pelo soro de coelho sensibilizado com HSP70. Utilizaram-se cortes histológicos que foram desparafinados em Xilol e hidratadas em soluções decrescentes de álcool (Absoluto 1, Absoluto 2, Álcool 90%, Álcool 80%, Álcool 70% e água destilada) para posterior incubação em solução para bloqueio de peroxidase [Peroxido de hidrogênio (H_2O_2)30vv à 4% em 0,01M de PBS pH7,2] seguido de incubação em banho de leite (12g de leite em pó diluído em 200ml PBS) para bloqueio de sítios inespecíficos. Soro de coelho sensibilizado com HSP70 diluído em PBS BSA 0,1% foi utilizado como anticorpo primário, em quatro diluições. As lâminas foram incubadas em câmara úmida à 4° de 16 a 18 horas. Após lavagem em PBS (0,01M) as lâminas foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo secundário (Dako LSAB2 System-HRP). Para a revelação da reação utilizou-se 0,05g de diaminobenzidina (DAB) diluída em 200ml de PBS juntamente ao peróxido de hidrogênio 40vv à 0,16% durante cinco minutos. As lâminas foram então contracoradas com Hematoxilina de Harris e posteriormente desidratadas, diafanizadas e montadas com lamínulas.

Protocolo 2 (P2):

No P2 foi realizada recuperação antigênica/reativação enzimática dos epítomos com a enzima proteinase K (20mg/ml). Após a hidratação em banhos de álcool, as lâminas foram adicionadas a solução de protinase K (20µl de proteinase K diluídos em

200ml de PBS durante 20 minutos. Após esse processo, deu-se continuidade à IHQ conforme o P1.

Protocolo 3 (P3):

No P3 foi realizada recuperação antigênica/reativação por calor dos epítopos com Tampão Citrato em panela tipo Pascal. Após a hidratação em álcool as lâminas foram imersas e vedadas em cuba com solução de Tampão Citrato pH 6 à 10% e acondicionadas na panela tipo Pascal. A cuba foi removida da panela Pascal para resfriamento (vinte minutos à temperatura ambiente). Após esse processo, deu-se continuidade à IHQ conforme o P1 (**FIGURA 1**).

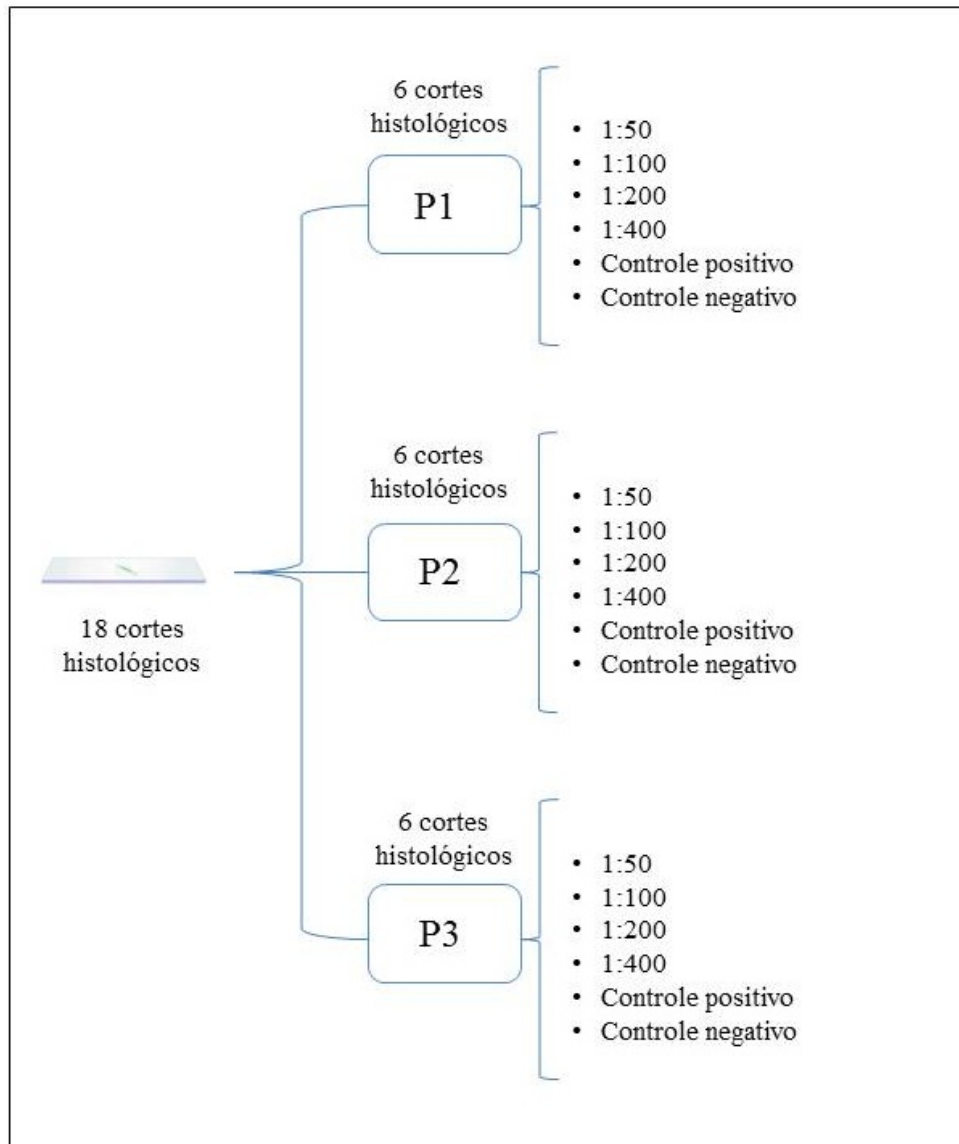


FIGURA 1: Distribuição dos cortes histológicos de acordo com os protocolos (P1, P2 e P3) para a padronização da técnica de IHQ.

4.2.4 MELHORIAS NA TÉCNICA DE IHQ

Para melhores resultados na evidenciação da imunomarcacão das formas amastigotas de *Leishmania*, foram estabelecidos bloqueios adicionais à técnica de IHQ para evitar marcações inespecíficas.

4.2.4.1 *Bloqueio em metanol*

Utilizado para aumentar o bloqueio da peroxidase endógena a partir da solução previamente padronizada no LPL, constituída por: 162ml de Metanol; 12ml de H₂O₂ e 6ml de água destilada. Conforme descrito no item 4.3.1. foi utilizada a amostra positiva do acervo do LPL para a confecção de três cortes histológicos (um para o bloqueio, um para o controle negativo e um para o controle positivo da reação) que foram desparafinados em Xilol e hidratados em soluções decrescentes de álcool (Absoluto 1, Absoluto 2, Álcool 90%, Álcool 80%, Álcool 70% e água destilada) para posterior incubação em solução de metanol (dois banhos de quinze minutos, cada). Em seguida as lâminas passaram por lavagem em PBS (0,01M) e seguiu-se a técnica de IHQ conforme descrito no item 4.2.3.

4.2.4.2 *Bloqueio com soro de cabra*

Utilizado para aumentar o bloqueio da peroxidase endógena. Utilizou-se a coleta de sangue de cabra, *Capra aegagrus hircus*, saudável, oriundo da Escola de Veterinária/UFMG. Após antissepsia com álcool 70% da região esquerda do pescoço do animal, coletou-se 3,0 ml de sangue através de punção venosa jugular com o auxílio de uma seringa descartável estéril de 5cc com agulha descartável estéril de calibre 21G1 (0.80 mm x 25 mm) da marca BD®. Após a coleta, o sangue foi armazenado em tubo para coleta de soro e encaminhado para o LPL, ICB/UFMG. Após coagulação à 37°C, a amostra foi centrifugada à 10.000rpm durante 10 minutos à 4°C para obtenção do soro e seu posterior congelamento à -20°C.

Determinou-se a diluição do soro de cabra em duas concentrações, conforme técnica previamente padronizada no LPL, sendo elas: 1) 1:20 e 2) 1:200 em PBS BSA 0,1%. Conforme descrito no item 4.3.1. foi utilizada a amostra positiva do acervo do LPL para a confecção de quatro cortes histológicos (dois para o bloqueio em ambas concentrações, um para o controle negativo e um para o controle positivo da reação) que foram desparafinados em Xilol e hidratados em soluções decrescentes de álcool (Absoluto 1, Absoluto 2, Álcool 90%, Álcool 80%, Álcool 70% e água destilada) para posterior incubação em solução de metanol (dois banhos de quinze minutos, cada).

Em seguida as lâminas passaram por lavagem em PBS (0,01M) e seguiu-se a técnica de IHQ conforme descrito no item 4.3.3.

4.2.4.3 Bloqueio com soro de coelho

Utilizado para aumentar o bloqueio da peroxidase endógena, utilizou-se sangue oriundo da coleta do coelho da raça Nova Zelândia, saudável, oriundo biotério do ICB/UFMG. Após antissepsia com álcool 70% da orelha esquerda e coletou-se 3,0 ml de sangue através de punção venosa auricular com o auxílio de uma seringa descartável estéril de 5cc com agulha descartável estéril de calibre 21G1 (0.80 mm x 25 mm) da marca BD®. Após a coleta, o sangue foi armazenado em tubo para coleta de soro e encaminhado para o LPL, ICB/UFMG. Após coagulação à 37°C, a amostra foi centrifugada à 10.000rpm durante 10 minutos à 4°C para obtenção do soro e seu posterior congelamento à -20°C.

Determinou-se a diluição do soro de coelho em duas concentrações, conforme técnica previamente padronizada no LPL, descritas a seguir: 1) Deluição 1:20 e 2) Deluição 1:200 em PBS BSA 0,1.

Conforme descrito no item 4.3.1. utilizou-se a amostra positiva do acervo do LPL para a confecção de quatro cortes histológicos (dois para o bloqueio em ambas concentrações, um para o controle negativo e um para o controle positivo da reação) que foram desparafinados em Xilol e hidratados em soluções decrescentes de álcool (Absoluto 1, Absoluto 2, Álcool 90%, Álcool 80%, Álcool 70% e água destilada) para posterior incubação em solução de metanol (dois banhos de quinze minutos, cada). Em seguida as lâminas passaram por lavagem em PBS (0,01M) e seguiu-se a técnica de IHQ conforme descrito no item 4.3.3.

4.2.4.4 Maiores diluições do anticorpo primário

Para melhor conhecimento sobre o potencial de imunomarcacão das formas amastigostas de *Leishmania* utilizando-se o soro de coelho sensibilizado com a HSP70, realizou-se uma nova bateria de IHQ com maiores diluições do anticorpo primário, sendo elas, 1) 1:600; 2) 1:800; 3) 1:1000; 4) 1:2000 e 5) 1: 4000.

4.2.5 CONTROLE NEGATIVO

Para a realização de todas as técnicas descritas no item 4.3. utilizou-se como controle negativo da reação a substituição do anticorpo primário por PBS 0,01M. A fim de avaliar as possíveis interferências nas reações de IHQ, também foi utilizado como controle negativo da reação o soro de coelho da raça Nova Zelândia, saudável, nas seguintes diluições: 1)1:50 2)1:100 3) 1:200 e 4) 1:400.

Após a padronização da técnica de IHQ-HSP70, foi realizada a comparação entre o novo método e a técnica de IHQ segundo Tafuri et. al (2004). Vinte e nove amostras de pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, emblocados em parafina, foram selecionados do acervo do LPL do Departamento de Patologia Geral do ICB/UFMG. Todas as amostras foram oriundas de cães previamente testados por métodos sorológico (RIFI) e parasitológico (IHQ) positivos. De cada fragmento de tecido foram confeccionadas lâminas histológicas em duplicata para realização das técnicas de IHQ.

Um corte histológico da amostra controle positivo do acervo com a coloração por Hematoxilina Eosina (HE) para avaliar as possíveis alterações histológicas. Deste mesmo material, também foram realizadas ambas técnicas de IHQ para futura comparação.

4.3 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE IHQ

4.3.1 ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA

Para a análise semi-quantitativa da carga parasitária na derme foi utilizado o parâmetro de distribuição segundo Figueiredo et al., (2010) com adaptações. Considerando-se a extensão dos fragmentos de tecido em todo o corte histológico, a região da derme foi avaliada e de acordo com o número de campos apresentando marcações de formas amastigotas de *Leishmania*, sendo os seguintes escores: 1) Discreto: 0 a 15 campos contendo formas amastigotas imunomarcadas. 2) Moderado:

15 a 30 campos contendo formas amastigotas imunomarcadas. 3) Intenso: >30 campos contendo formas amastigotas imunomarcadas.

A leitura foi realizada por dois patologistas treinados, com experiência de leitura na rotina laboratorial. Para isso, foi entregue a cada um uma caixa contendo as lâminas as quais ambas técnicas de IHQ foram empregadas, sem que houvesse identificação das mesmas a não ser por numeração, de um a cinquenta e oito (valor total dos vinte e nove cortes histológicos de fragmento de pele de orelha em duplicata).

4.3.2 ANÁLISE QUANTITATIVA

Vinte e cinco imagens foram aleatoriamente capturadas por fotomicrografia de cada corte histológico, de ambas técnicas de IHQ empregadas. Essas imagens foram então utilizadas para a contagem do número de formas amastigotas imunorreativas, visualizadas por tela de computador através um sistema computacional de análises de imagem KS300 (Carl Zeiss®, Germany). De cada corte histológico foi obtido a média da contagem das formas amastigotas de *Leishmania* em suas vinte e cinco capturas. Os dados foram então enviados ao software Prism 5.0 para que fossem analisados.

5 RESULTADOS

5.1. IMUNIZAÇÃO DO COELHO

Após a realização da sorologia com diluição total na técnica de ELISA, a média em T0 estabelecida foi de 0,0993 e seu respectivo *cut off* (duas vezes o valor da média) em 0,1986. Em T1 não houve resposta antigênica suficiente no soro. Em T2 obteve-se resposta antigênica positiva até a diluição de 1:1600. Em T3 houve resposta antigênica no soro na diluição de até 1:6400. De acordo com a titulação obtida em T3, o protocolo de três sensibilizações em intervalos de quinze dias mostrou-se eficaz na produção do soro sensibilizado a HSP70, possibilitando a coleta intracardíaca do volume total de 20ml de sangue para utilização do soro na técnica de IHQ proposta (FIGURA 2).

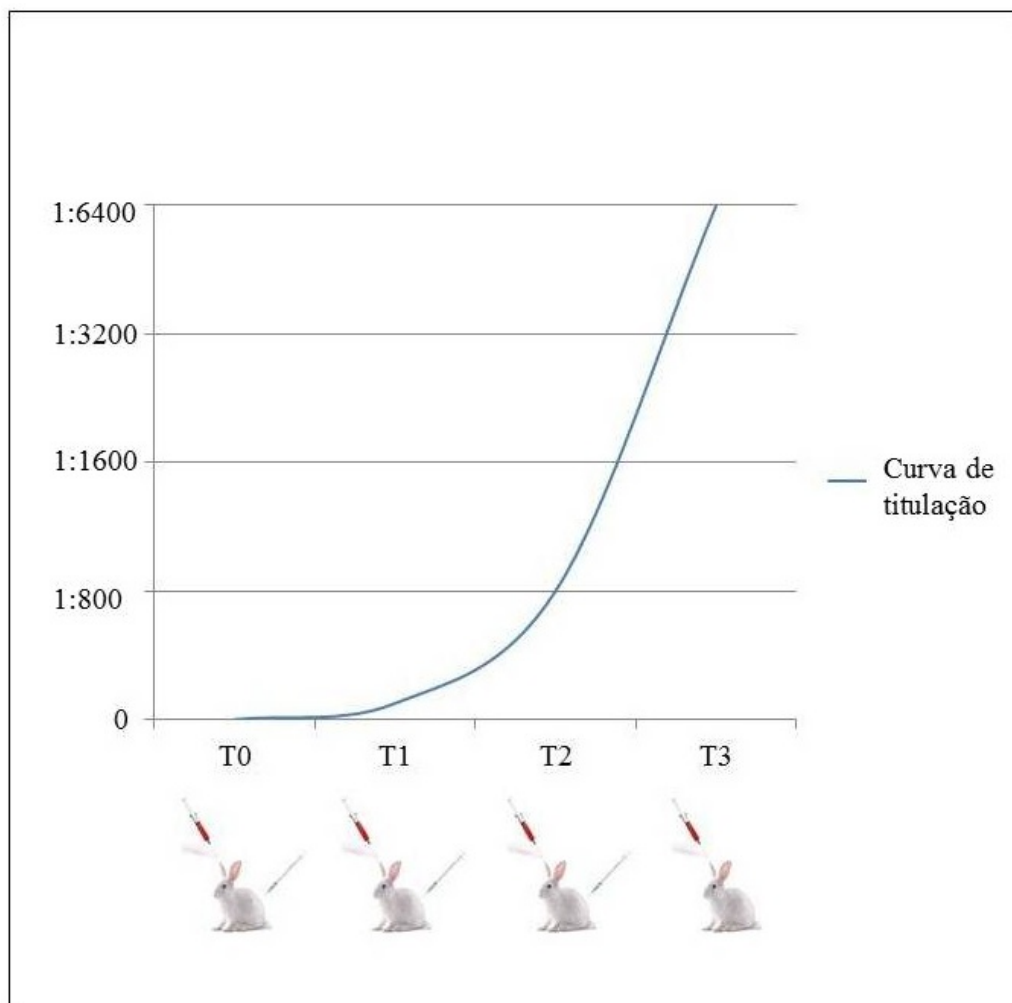


FIGURA 2: Esquema ilustrativo da imunização do coelho com HSP70. Intervalos de 15 dias entre as ensibilizações.

5.2 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA.

5.2.1. P1

Na análise qualitativa das lâminas do P1, através de microscopia de luz na objetiva de 40x, observou-se imunomarcacão de formas amastigotas em todas as diluições do soro de coelho sensibilizado com a HSP70 (1:50; 1:100; 1:200 e 1:400). Nas diluições de 1:50 e 1:100 foi observada imunomarcacão intensa de formas amastigotas, mas houve uma notável marcação celular e da matriz intersticial de forma inespecífica (*background*) de coloração marrom amarelado nas regiões histológicas da derme superficial (DS) e da derme profunda (DP), em especial aos anexos (folículos pilosos e glândulas) e matriz extracelular (tecido conjuntivo). Nas diluições de 1:200 e 1:400 havia imunomarcacão moderada das formas amastigotas, permanecendo intensa marcação inespecífica das regiões da derme. O corte histológico do controle positivo apresentou imunomarcacão intensa de formas amastigotas e marcação inespecífica ausente. O corte histológico do controle negativo não apresentou imunomarcacão para formas amastigotas assim como ausência de quaisquer imunomarcacões na região da derme.

5.2.2 P2

Na análise qualitativa das lâminas do P2, através de microscopia de luz na objetiva de 40x, observou-se imunomarcacão de formas amastigotas em todas as diluições do soro de coelho sensibilizado com a HSP70 (1:50; 1:100; 1:200 e 1:400). Nas diluições de 1:50 e 1:100 foi observada imunomarcacão intensa de formas amastigotas e intensa marcação inespecífica nas regiões da derme superficial (DS) e da derme profunda (DP), em especial aos anexos (folículos pilosos e glândulas) e matriz extracelular (tecido conjuntivo). Na diluição de 1:200 havia imunomarcacão intensa das formas amastigotas, permanecendo intensa marcação inespecífica das regiões da derme. Na diluição de 1:400 havia imunomarcacão intensa das formas amastigotas, com leve a moderada marcação inespecífica das regiões da derme. O corte histológico do controle positivo apresentou imunomarcacão intensa de formas

amastigotas e marcação inespecífica ausente. O corte histológico do controle negativo não apresentou imunomarcação para formas amastigotas assim como ausência de quaisquer imunomarcações na região da derme.

5.2.3 P3

Na análise qualitativa das lâminas do P3, através de microscopia de luz na objetiva de 40x, observou-se imunomarcação de formas amastigotas em todas as diluições do soro de coelho sensibilizado com a HSP70 (1:50; 1:100; 1:200 e 1:400). Nas diluições de 1:50 e 1:100 foi observada imunomarcação intensa de formas amastigotas e intensa marcação inespecífica nas regiões histológicas da derme superficial (DS) e da derme profunda (DP), em especial aos anexos (folículos pilosos e glândulas) e matriz extracelular (tecido conjuntivo). Nas diluições de 1:200 e 1:400 havia imunomarcação moderada das formas amastigotas, permanecendo intensa marcação inespecífica das regiões da derme. O corte histológico do controle positivo apresentou imunomarcação intensa de formas amastigotas e marcação inespecífica ausente. O corte histológico do controle negativo não apresentou imunomarcação para formas amastigotas assim como ausência de quaisquer imunomarcações na região da derme.

5.2.4 ESCOLHA DO PROTOCOLO E MELHORIA NA TÉCNICA

O resultado em P2 na diluição de 1:400 evidenciou de forma intensa a imunomarcação das formas amastigotas com discreto a moderada marcação inespecífica na região da derme, sendo, portanto, eleito o melhor protocolo dentre os realizados na padronização da técnica. Nos bloqueios adicionais de metanol, bloqueio com soro de cabra saudável e bloqueio com soro de coelho saudável não foram observadas melhorias quando comparadas a técnica da P2 na diluição de 1:400.

Na realização do P2 em maiores diluições, observou-se presença de imunomarcação de formas amastigotas em decrescente intensidade, de moderado a leve, conforme a diluição (1:600; 1:800; 1:1.000; 1:2.000 2 1:4.000), entretanto não

houve decréscimo de marcação inespecífica das regiões da derme quando comparadas ao P2 na diluição de 1:400. Diante dos resultados a técnica foi padronizada a partir do P2 na diluição de 1:400, sem a realização de bloqueios adicionais.

5.2.5 CONTROLE NEGATIVO COM SORO DE COELHO

Quando realizada a técnica de IHQ para o controle negativo com o soro de coelho saudável, de acordo com o P2, observou-se em todas as diluições (1:50; 1:100; 1:200 e 1:400) a marcação inespecífica em todo o corte histológico (epiderme e derme, exceto tecido cartilaginoso) variando de moderado em 1:50 a discreto em 1:100; 1:200 e 1:400.

5.3 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE IHQ

5.3.1. ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA

No parâmetro de distribuição, após leitura pareada entre os dois patologistas, encontrou-se uma correlação de 100%, tanto quando comparadas as leituras dos cortes histológicos corado pela técnica de IHQ segundo Tafuri et al. (2004) ou quando aquelas coradas pela técnica de IHQ-HSP70.

Analizando o corte histológico corado pelas técnicas rotineiras de Hematoxilina-Eosina (HE) de fragmentos de pele obtidos de animais controle positivo foi possível observar a inflamação crônica difusa atingindo toda a derme e caracterizada pelo exsudato celular composto por células mononucleadas, do tipo plasmohistiocitário (Figura 3A).

O método imuno-histoquímico da estreptoavidina-peroxidase foi realizada com o intuito de evidenciar formas amastigotas de *Leishmania* em marrom-acastanhado com contra-coloração usando o corante histológico, Hematoxilina de Harris. O protocolo segundo Tafuri, et al. (2004), que preconiza o uso de soro de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* (doença visceral) evidencia nitidamente os parasitos sem marcações inespecíficas (*background*) (FIGURA 3B). Já o protocolo utilizando o anticorpo (soro hiperimune de coelho) anti-HSP70 evidencia

formas amastigotas também na coloração marrom-acastanhada com frequente discreta marcação de sítios antigênicos inespecíficos a começar pelas células das camadas epiteliais (**Figura 3C**), matriz extracelular (interstício) da derme (superficial e profunda) (**Figura 3C**) e com frequência nas células e interstício dos anexos (células glandulares e vasos (**Figura 3C**).

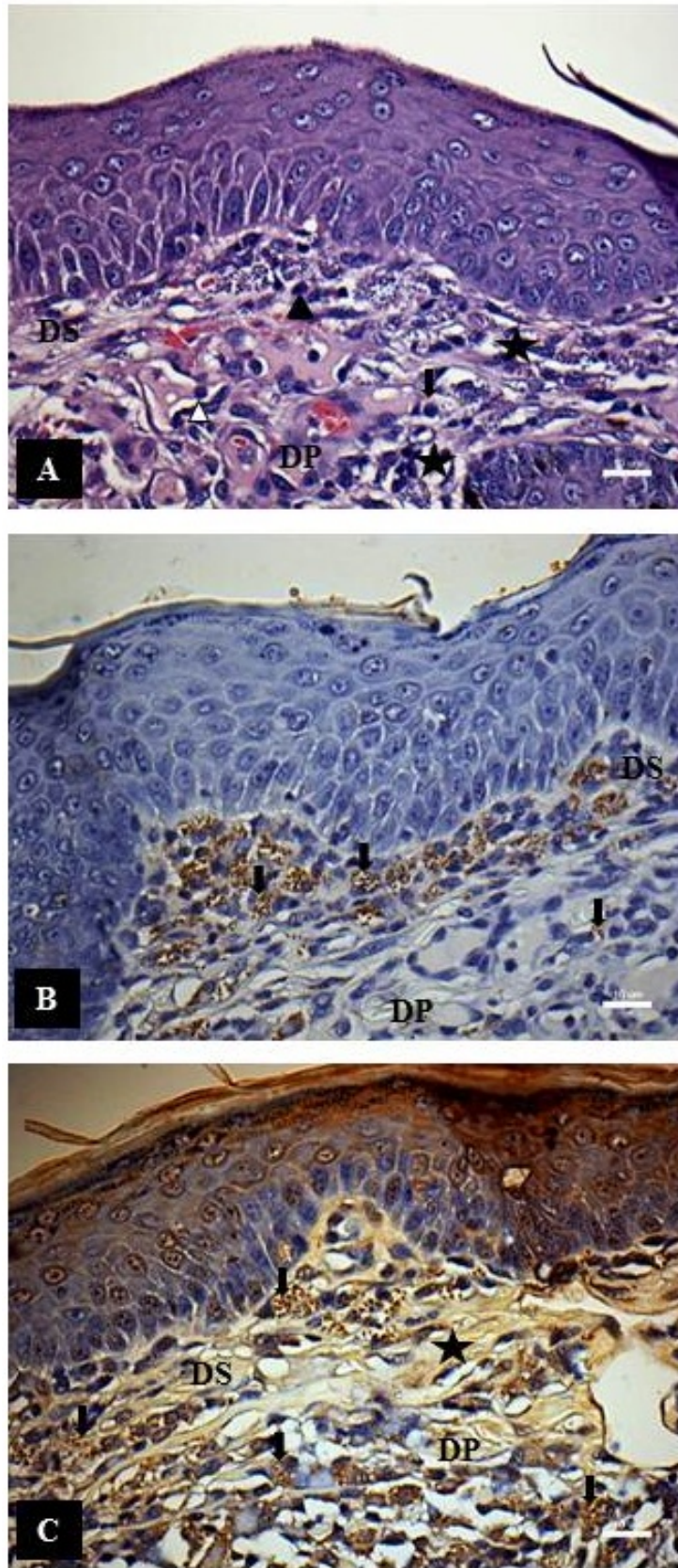


FIGURA 3: Corte histológico de pele de orelha de cão naturalmente infectado por *L. infantum*. (A): Inflamação plasmohistiocitária na região da DS e DP (estrelas). Notar macrófago (seta), plasmócito (ponta de seta em negro) e linfócito (ponta de seta em branco). Hematoxilina Eosina 40x. (B): Formas amastigotas de *L. infantum* imunomarcadas em marrom acastanhado (setas) na região da DS e DP. IHQ segundo Tafuri et al. (2004), contraindicada por Hematoxilina de Harris. (C): Formas amastigotas de *L. infantum* imunomarcadas em marrom acastanhado (setas) na região da DS e DP. Presença de marcação inespecífica em matriz extracelular (estrela). IHQ-HSP70, contraindicada por Hematoxilina de Harris. DS: Derme superficial. DP: derme profunda.

De acordo com os escores pré-estabelecidos obteve-se o resultado após a leitura de ambas os patologistas, a seguir: Escore 1: Vinte (68,9%) cortes histológicos. Escore 2: Um corte histológico (3,5%). Escore 3: Oito (27,6%) cortes histológicos (**TABELA 1**).

TABELA 1: Número de cortes histológicos e sua respectiva porcentagem em cada escore nas técnicas de IHQ segundo Tafuri et al. (2004) IHQ-HSP70, respectivamente.

AVALIADOR	MÉTODOS					
	Tafuri et al. (2004)			IHQ-HSP70		
	ESCORE			ESCORE		
	1	2	3	1	2	3
A	20 (68,9%)	1 (3,5%)	8 (27,6%)	20 (68,9%)	1 (3,5%)	8 (27,6%)
B	20 (68,9%)	1 (3,5%)	8 (27,6%)	20 (68,9%)	1 (3,5%)	8 (27,6%)

Nos cortes histológicos do Escore 1 é possível observar a discreta presença de formas amastigotas imunomarcadas em ambas técnicas de IHQ, principalmente na região da derme profunda. Na técnica de IHQ-HSP70 é possível observar marcação inespecífica moderada na região da derme profunda, especialmente nos anexos (glândulas e folículos pilosos) e no tecido conjuntivo, conforme descrito anteriormente (**FIGURA 4**).

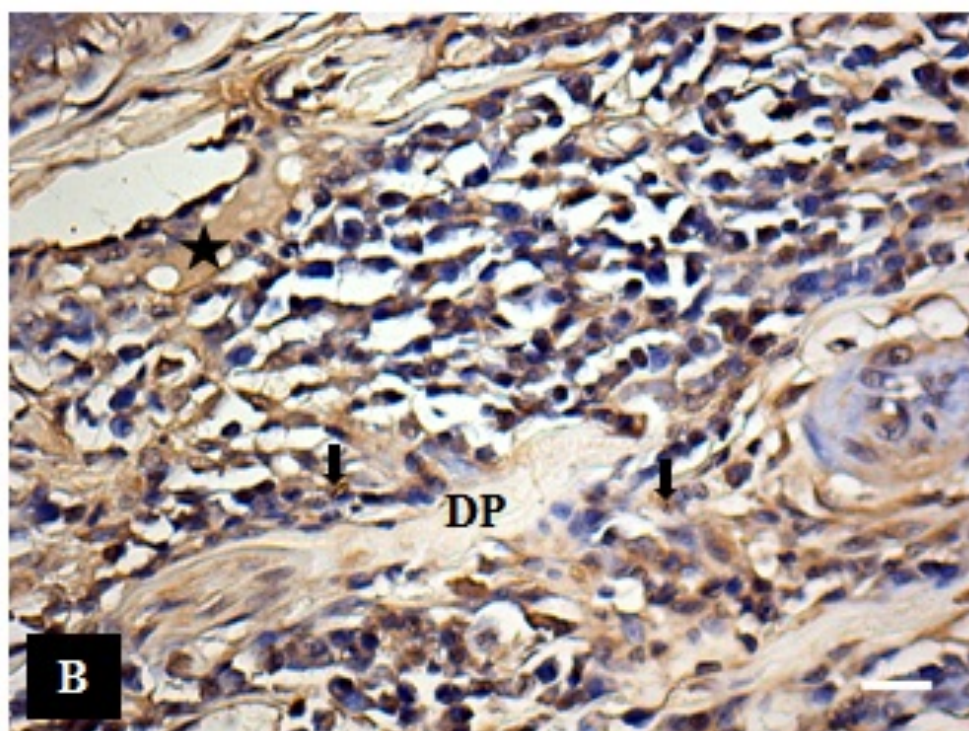
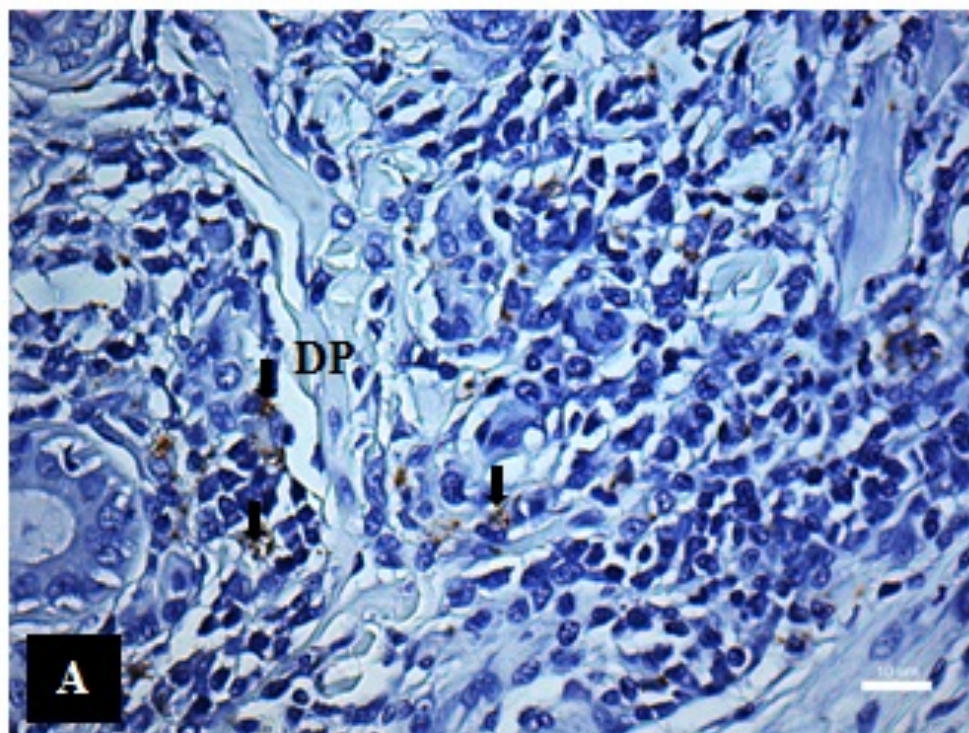


FIGURA 4: Cortes histológicos de pele de orelha de cão naturalmente infectado por *L. infantum* classificadas no escore 1. (A): Discreta presença de formas amastigotas de *L. infantum* imunomarcadas em marrom acastanhado (setas) na região da DP. IHQ segundo Tafuri et al. (2004), contraincolorada por Hematoxilina de Harris. (B): Discreta presença de formas amastigotas de *L. infantum* imunomarcadas em marrom acastanhado (setas) na região da DP. Presença de marcação inespecífica em matriz extracelular (estrela). IHQ-HSP70, contraincolorada por Hematoxilina de Harris. DS: Derme superficial. DP: derme profunda.

Nos cortes histológicos do escore 2 é possível observar a moderada presença de formas amastigotas imunomarcadas em ambas técnicas de IHQ, principalmente na região da derme profunda. De forma repetitiva, na técnica de IHQ-HSP70 encontrou-se marcação inespecífica moderada na região da derme profunda, especialmente nos anexos (glândulas e folículos pilosos) e no tecido conjuntivo (**FIGURA 5**).

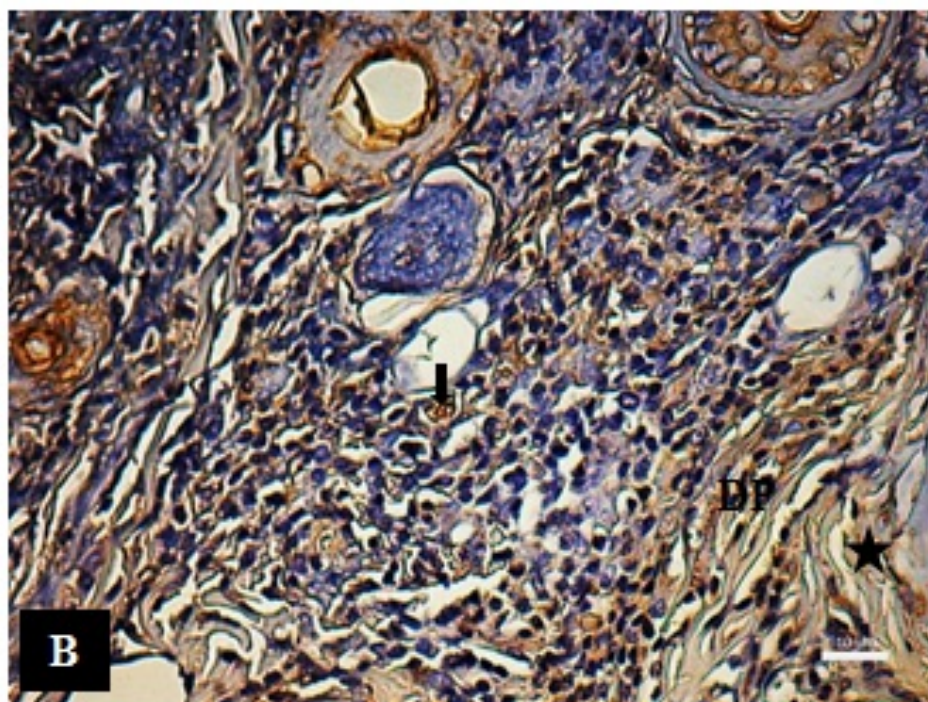
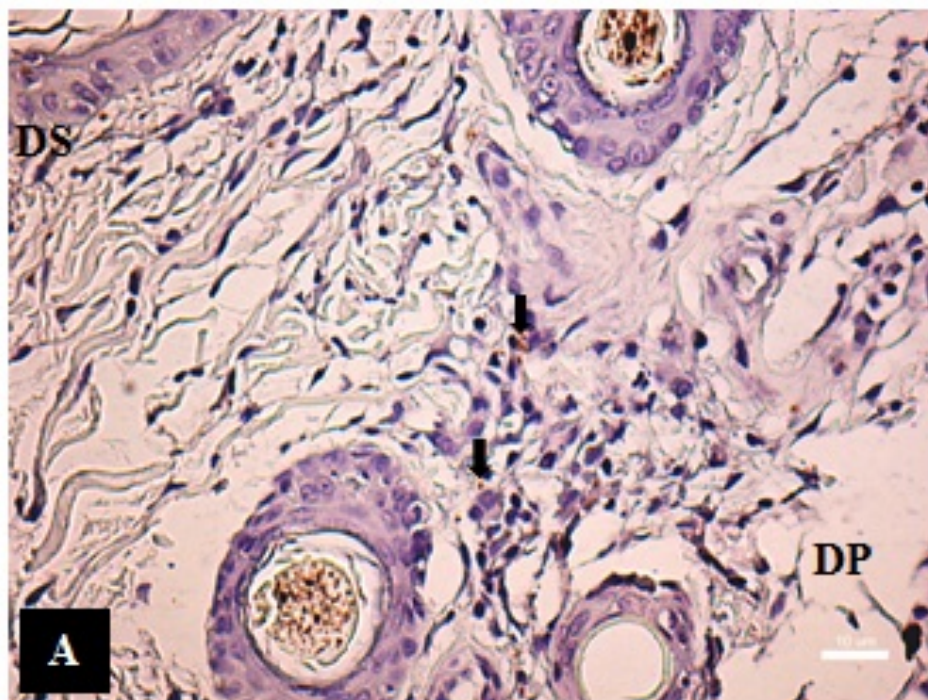


FIGURA 5: Cortes histológicos de pele de orelha de cão naturalmente infectado por *L. infantum* classificadas no escore 1. (A): Moderada presença de formas amastigotas de *L. infantum* imunomarcadas em marrom acastanhado (setas) na região da DP. IHQ segundo Tafuri et al. (2004), contraincorada por Hematoxilina de Harris. (B): Moderada presença de formas amastigotas de *L. infantum* imunomarcadas em marrom acastanhado (setas) na região da DP. Presença de marcação inespecífica em matriz extracelular (estrela). IHQ-HSP70, contraincorada por Hematoxilina de Harris. DS: Derme superficial. DP: derme profunda.

Nos cortes histológicos do Escore 3 foi possível observar a intensa presença de formas amastigotas imunomarcadas em ambas técnicas de IHQ, em toda a região da derme, superficial e profunda. Na técnica de IHQ-HSP70 ocorreu novamente a marcação inespecífica na região da derme, especialmente nos anexos (glândulas e folículos pilosos) e no tecido conjuntivo (**FIGURA 6**).

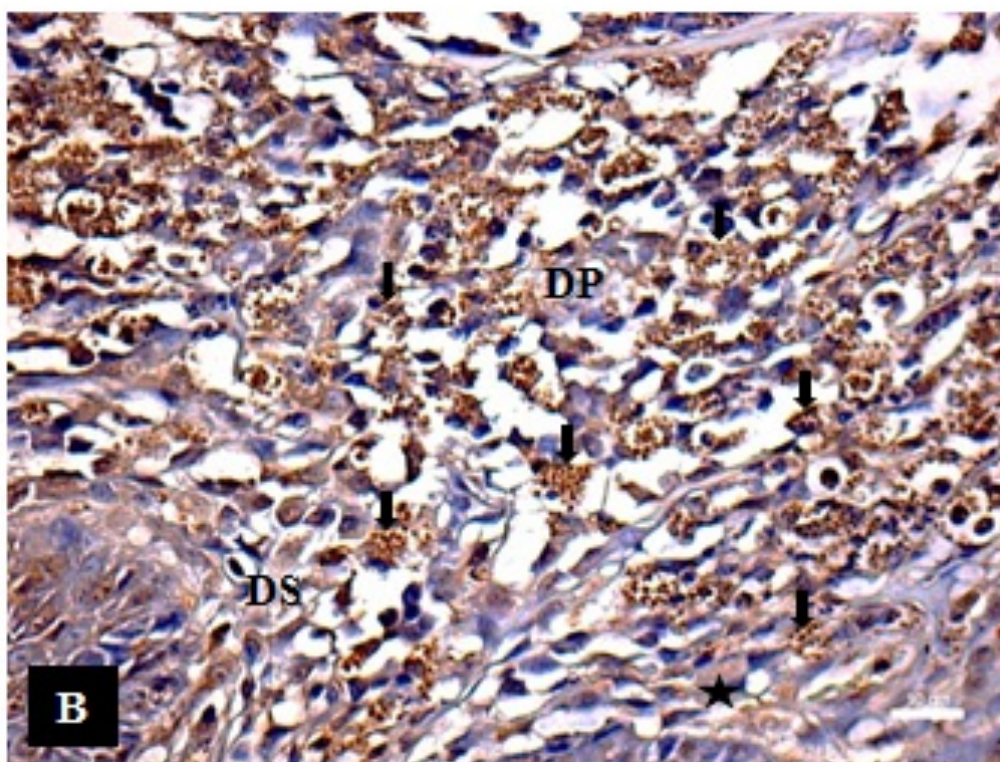
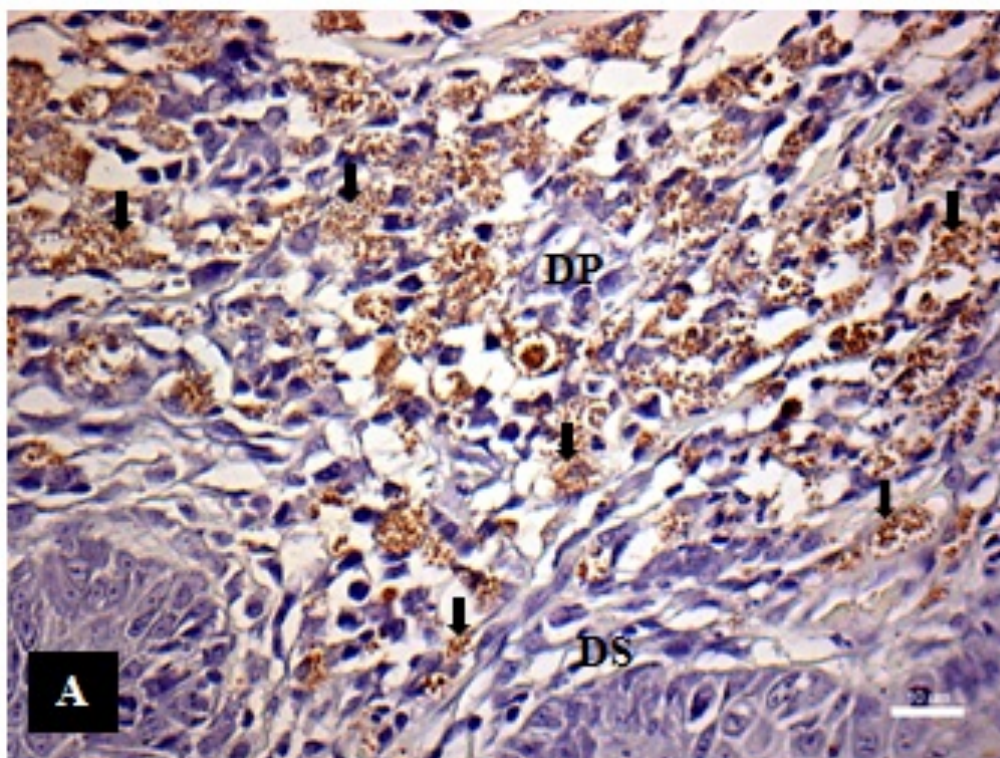


FIGURA 6: Cortes histológicos de pele de orelha de cão naturalmente infectado por *L. infantum* classificadas no escore 1. (A): Intensa presença de formas amastigotas de *L. infantum* imunomarcadas em marrom acastanhado (setas) na região da DP. IHQ segundo Tafuri et al. (2004), contracorada por Hematoxilina de Harris. (B): Intensa presença de formas amastigotas de *L. infantum* imunomarcadas em marrom acastanhado (setas) na região da DP. Presença de marcação inespecífica em matriz extracelular (estrela). IHQ-HSP70, contracorada por Hematoxilina de Harris. DS: Derme superficial. DP: derme profunda.

5.3.2 Análise quantitativa

Inicialmente a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os aspectos não paramétricos dos dados foram avaliados usando o teste Mann-Whitney. As análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 3.03 (San Diego, CA, USA). A diferença estatística foi considerada significativa quando os valores de p foram $< 0,05$. Em ambos testes de IHQ observou-se áreas de imunomarcção para formas amastigotas de *Leishmania infantum* que foram observadas distribuídas difusamente pela região da derme superficial e da derme profunda. Não havendo diferença estatística entre os grupos em que foram realizadas as técnicas de IHQ segundo Tafuri et al. (2004) e IHQ-HSP70 ($p < 0,5068$).

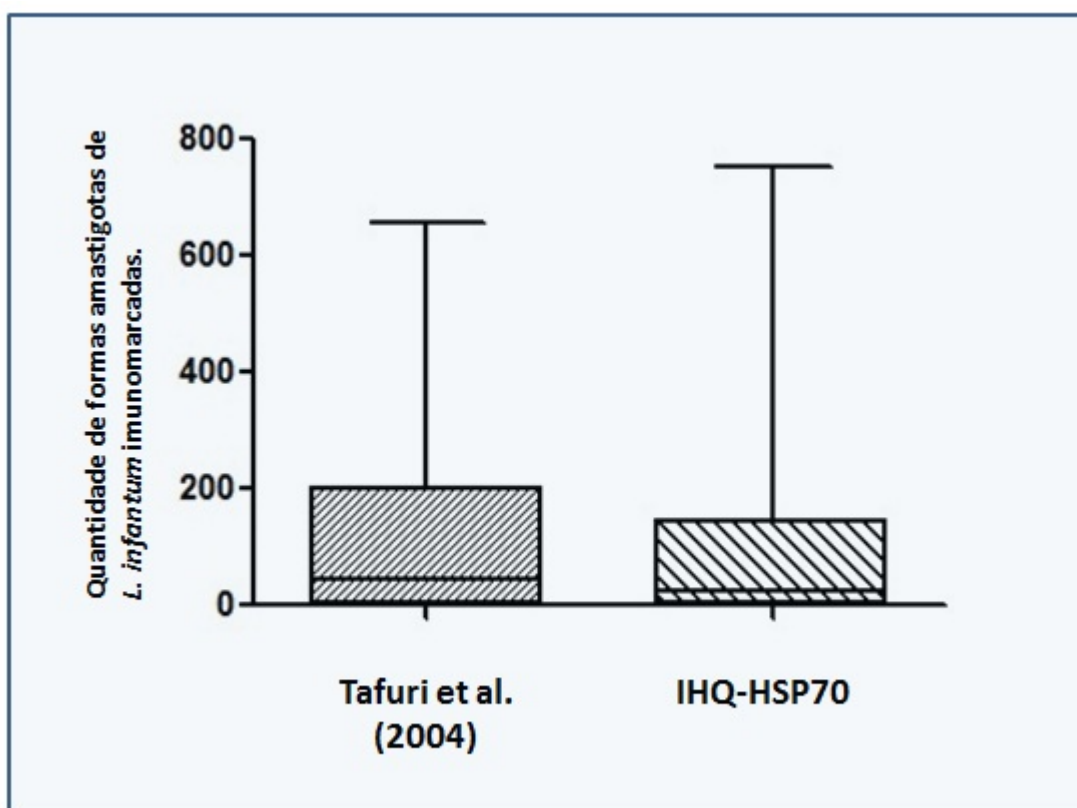


GRÁFICO 1: Mediana da quantidade de formas amastigotas de *L. infantum* imunomarcadas através das técnicas de IHQ segundo Tafuri et al. (2004) e IHQ-HSP70.

6 DISCUSSÃO

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) é uma ferramenta diagnóstica indispensável nos laboratórios de patologia como uma das ferramentas de diagnóstico para as leishmanioses. Sua execução é de alta complexidade e abrange diversas etapas de trabalho em fases pré-analítica, analítica e pós-analítica. Quaisquer possíveis erros que ocorram em alguma dessas etapas culminarão em resultados improdutivos e não confiáveis. De maneira geral, a IHQ é um ensaio altamente reprodutível e confiável quando executada em fragmentos de tecido adequadamente fixados e processados em parafina em conformidade com o procedimento de coloração idêntico ao do processo de validação para o anticorpo utilizado (FERRO, 2013; TORLAKOVIC et al., 2010).

Evidenciar o antígeno desejado por imunomarcação a partir de fragmentos de tecidos é o principal objetivo da IHQ. Assim, LIN et al. (2014) atualizaram em seu estudo as diretrizes recentemente propostas sobre validação de anticorpos em padronizações de IHQ do Centro de Patologia e Laboratório de Patologias da Faculdade de Patologia Americana (Departamento do Laboratório de Medicina, Geisinger Medical Center, Danville, Pensilvânia, Estados Unidos). Os autores descrevem que o objetivo final é alcançar uma alta resolução na imunomarcação sem imunomarcações inespecíficas gerando as chamadas “colorações de fundo” (*background*) usando maior diluição possível de anticorpos primários (para evitar o consumo elevado anticorpos primários para redução do custo final da técnica).

A técnica de IHQ alternativa para a imunomarcação de formas amastigotas de *Leishmania* proposta por TAFURI et al. (2004) contempla o protocolo de imunoperoxidase (estreptavidina-biotina-peroxidase) baseando-se na utilização de soro hiperimune de cães naturalmente infectados por *L. infantum* resultando em uma técnica de baixo custo e prontamente disponível quando comparada aquelas que utilizam anticorpos monoclonais ou policlonais anti-*Leishmania* presentes no mercado. Alguns estudos prévios na literatura demonstraram a eficácia dessa técnica alternativa de IHQ. XAVIER et al. 2006, por exemplo, evidenciaram uma boa correlação positiva entre a IHQ e a PCR, em fragmentos de pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, sem que houvesse diferença estatística dentre as técnicas de diagnóstico. Os achados de AMORIM et al. 2011 foram de encontro com os de Xavier et al. 2006 mostrando ainda uma correlação positiva entre a IHQ e o

xenodiagnóstico. ALVES et al. 2013 e ARAGÃO et al. (2015) demonstraram utilização dessa técnica IHQ no diagnóstico de LTA nas suas diferentes formas clínicas com a sensibilidade de 91,78%, sendo maior do que quando se utilizou a IHQ empregando anticorpo primário monoclonal disponível no mercado. Os autores discutem que o teste de IHQ alternativa de TAFURI et al. 2004 exibe elevada sensibilidade, baixo custo, rapidez e facilidade de execução quando comparada à outras técnicas utilizadas.

O presente estudo teve como objetivo realizar imunomarcção de formas amastigotas de *L. infantum* através da otimização dessa técnica de IHQ, a partir da produção do soro de coelho sensibilizado com HSP70, utilizado como anticorpo primário, seguida de sua comparação com a IHQ segundo TAFURI et al. (2004). Essa ideia baseou-se no fato da difícil aplicabilidade comercial da técnica preconizada por TAFURI et al. (2004), pois há necessidade de um cão naturalmente infectado por *L. infantum* para coleta de seu sangue e consequente obtenção do soro hiperimune para a utilização nessa técnica.,

Estudos proteômicos com *Leishmania* evidenciaram a possibilidade da utilização de marcadores biológicos para o diagnóstico da leishmaniose. Lima et al. (2016) ao utilizarem três das espécies mais comuns de *Leishmania* no estado Minas Gerais, *L. infantum*, *L.(V.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* caracterizou seus antígenos e determinou suas reatividades imunogênicas ao soro hiperimune de cão, constatando que HSP70 foi reativa simultaneamente para as três espécies estudadas. Nosso grupo de pesquisa idealizou a utilização da HSP70r no presente trabalho por se apresentar como uma molécula bem conservada com sua utilização consagrada em métodos de reatividade imunogênica na Leishmaniose.

O soro de coelho sensibilizado com a HSP70 produzido permitiu sua utilização na técnica de IHQ proposta, sendo utilizado como anticorpo primário policlonal. Segundo os autores RAMOS-VARA (2002), FERRO (2013) e LIN et al. (2014), a utilização de anticorpos policlonais na padronização de técnicas de IHQ apresentam a vantagem frente aos anticorpos monoclonais, uma vez que possibilitam sua utilização em diluições elevadas, acima de 1:1000, favorecendo a redução do custo da técnica. Aqui demonstramos a possibilidade e imunomarcção de formas amastigotas de *L. infantum* com a técnica de IHQ otimizada nas diluições do anticorpo primário em até 1:4000. O custo e o tempo para a produção também vão de encontro

ao que foi relatado pelos autores, quando comparado a produção de anticorpos monoclonais.

Nas padronizações de técnicas imuno-histoquímicas a análise qualitativa dos possíveis resultados para as imunomarcações variam dentro de três possibilidades: (1) Imunomarcações intensas com marcação inespecífica ausente, moderada ou intensa, (2) Imunomarcações fracas com marcação inespecífica ausente, moderada ou intensa e (3) Imunomarcações ausentes com marcação inespecífica ausente, moderada ou intensa. FERRO (2013) e LIN et al. (2014) descrevem que no ensaios de IHQ para padronização do anticorpo primário que resultem, inicialmente, nas variações da primeira possibilidade (imunomarcações intensas), é possível afirmar que o anticorpo primário é viável para a técnica de IHQ. Na padronização de IHQ descrita nesse trabalho observou-se intensa imunomarkação de formas amastigotas de *L. infantum* em fragmento de pele de cães naturalmente infectados, com marcação inespecífica discreta a moderada dos componentes da derme. A presença de marcação inespecífica visualizada na otimização proposta, portanto não é um fator que descarte a qualidade do anticorpo primário produzido. Mesmo assim, foram realizados protocolos na tentativa de melhoria da técnica de otimização de IHQ (bloqueio em metanol, bloqueio com soro de cabra, bloqueio com soro de coelho e maiores diluições do anticorpo primário) sem que houvesse sucesso. Dessa forma, entende-se a necessidade de eliminar a marcação inespecífica para uma maior resolução no desenvolvimento do anticorpo primário. É importante ressaltar que o anticorpo policlonal produzido a partir de coelho sensibilizado foi utilizado na forma de soro total, obtido após extração dos elementos celulares por centrifugação, contendo diversos anticorpos e proteínas circulantes (albumina, alfa e beta globulinas) que podem ter contribuído para a marcação inespecífica observada (*background*).

No presente estudo, vinte e nove amostras de fragmento de orelha de cães naturalmente infectados com *L. infantum* foram testados para as técnicas de IHQ segundo TAFURI, et al. 2004 e segundo a otimização aqui proposta. Na análise semi-quantitativa houve correlação absoluta entre as técnicas quando foram analisadas sob microscopia óptica, em paralelo, por dois patologistas treinados. FIGUEIREDO et al. (2010) e MADEIRA et al. (2016) utilizaram a técnica de análise semi-quantitativa com a leitura pareada por dois patologistas para obtenção de dados semi-quantitativos, O resultado obtido reitera a qualidade do soro de coelho sensibilizado com a HSP70 em

sua qualidade diagnóstica na utilização do teste de IHQ. De forma complementar, a análise quantitativa foi realizada por microscopia óptica e análises morfométricas. Vinte e cinco imagens foram aleatoriamente capturadas e utilizadas para a contagem de amastigotas imunorreativas. As imagens foram analisadas por software, visualizadas por tela de computador e enviadas a um sistema computacional de análises de imagem KS300 (Carl Zeiss®, Germany). Cada forma amastigota presente na imagem foi individualmente selecionada de forma manual (*point*), para evitar qualquer seleção de marcação inespecífica, quando presente. O software Prism 5.0 foi utilizado para a análise dos dados. Não houve diferença estatística entre os testes de IHQ ($P < 0,05$).

Em resumo, foi evidenciado o potencial do soro de coelho sensibilizado a HSP70 utilizado como anticorpo primário na otimização do teste de IHQ segundo TAFURI et al. (2004). A HSP70 foi previamente avaliada em outros trabalhos quanto a sua antigenicidade, em sua utilização em testes diagnósticos ou mesmo como candidata a estudos vacinais (RICO et al., 2002; ZURITA et al., 2003).

7 CONCLUSAO

O presente trabalho permitiu evidenciar que foi possível desenvolver nova IHQ a partir da produção do anticorpo primário de baixo custo, mantendo a sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico somado a potencial possibilidade de replicabilidade em escala comercial pelo fato de ser produzido a partir do soro de coelho sensibilizado.

8 PERSPECTIVAS

1) O soro de coelho sensibilizado com a HSP70 atingiu titulação máxima no ELISA em T3 em 1:6400. Pretende-se realizar nova sensibilização de um novo coelho para estudar as possíveis alterações na otimização da técnica de IHQ caso aumentemos o numero de doses na sensibilização, objetivando a produção do soro com titulações mais elevadas em anticorpos anti-HSP70. Ainda, com relação ao soro de coelho sensibilizado, pretende-se realizar a purificação de frações IgG anti-HSP70 (soro de fração de imunoglobulinas e/ou soro de afinidade isolada).

2) Variações nos tempos de bloqueio, tempo de incubação com o anticorpo primário e/ou secundário devem ser realizadas.

3) Pretende-se avaliar a otimização da técnica de IHQ em outras formas clínicas da leishmaniose, uma vez que a HSP70 é um antígeno comum as espécies *L. infantum*, *L.(V.)amazonensis* e *L.(V.) braziliensis*, possuindo grande potencial dignóstico para as formas tegumentares da leishmaniose.

4) Pretende-se avaliar a otimização da técnica de IHQ em outras espécies, como *Trypanosoma cruzi*, com a finalidade de elucidar possíveis reações cruzadas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBEHUSEN, M. M. C. et al. Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

AGUILAR, C. M. et al. **Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1989.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

ALVES, C. F. et al. American Tegumentary Leishmaniasis: Effectiveness of an Immunohistochemical Protocol for the Detection of *Leishmania* in Skin. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

BARBOSA, E. B. et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366–375, 2012.

BARRIOS, C. et al. Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules. II: The use of the 70-kDa mycobacterial heat-shock protein as carrier for conjugated vaccines can circumvent the need for adjuvants and *Bacillus Calmette Guérin* priming). **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 6, p. 1365–1372, 1992.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tegumentar americana**. [s.l.: s.n.].

BRASIL, M. DA S. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. [s.l.: s.n.].

CASTRO, E. A. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). **Experimental Parasitology**, v. 117, n. 1, p. 13–21, 2007.

CASTRO, R. S. et al. Hepatic fibropoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania*

(*Leishmania*) infantum treated with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol. **Veterinary Parasitology**, v. 250, n. December 2017, p. 22–29, 2018.

COSTA, M. M. et al. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. **Journal of proteome research**, v. 10, n. 5, p. 2172–2184, 2011.

DANTAS-TORRES, F. Leishmune?? vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 1–2, p. 1–8, 2006.

DE AMORIM, I. F. G. et al. Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

FERRO, A. B. Imunohistoquímica. **Instituto Politécnico De Lisboa**, v. 1, p. 1–127, 2013.

FIGUEIREDO, M. M. et al. Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 7, p. 877–887, 2010.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11–12, p. 1169–1180, 2005.

KAUFMANN, S. H. Heat shock proteins and the immune response. **Immunology today**, v. 11, n. 4, p. 129–136, 1990.

LIMA, B. S. S. et al. Immunoproteomic and bioinformatic approaches to identify secreted *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. infantum* proteins with specific reactivity using canine serum. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 115–119, 2016.

LIN, F.; CHEN, Z. Standardization of diagnostic immunohistochemistry: Literature review and Geisinger experience. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 138, n. 12, p. 1564–1577, 2014.

LUNEDO, S. N. et al. Immunocytochemical and immunohistochemical methods as auxiliary techniques for histopathological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Acta Histochemica**, v. 114, n. 3, p. 252–258, 2012.

MADEIRA, I. M. V. M. et al. Immunohistochemical study of hepatic fibropoiesis associated with canine visceral leishmaniasis. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 97, n. 2, p. 139–149, 2016.

MADEIRA, M. F. et al. Mixed infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 5, p. 442–445, 2006.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941–2947, 2008.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 6, n. 9, p. 754–765, 2008.

PETERSEN, K.; ET AL. Detection Methods. **EDUCAT IO NA L Immunohistochemical Staining Methods**, p. 78–93, 2013.

RAMOS-VARA, J. A. Technical Aspects of. **Veterinary Pathology**, v. 2, n. 3, p. 195–200, 2002.

REITHINGER, R. et al. Reithinger et al. 1999 - Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in dog blood and bone marrow.pdf. v. 38, n. 2, p. 748–751, 2000.

RICO, A. I. et al. The heat shock proteins, Hsp70 and Hsp83, of *Leishmania infantum* are mitogens for mouse B cells. **Cell Stress and Chaperones**, v. 7, n. 4, p. 339–346, 2002.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by leishman and donovan. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2237, p. 1261–1262, 1903.

RYAN, P. R. et al. The domestic dog, a potential reservoir for *Leishmania* in the Peten region of Guatemala. **Veterinary Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 1–7, 2003.

SILVA, L. C. et al. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease.

International Journal of Experimental Pathology, v. 94, n. 2, p. 133–143, 2013.

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n. 1–2, p. 17–23, 2004.

TOLEZANO, J. E. et al. The first records of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3–4, p. 280–284, 2007.

TORLAKOVIC, E. E. et al. Canadian Association of Pathologists-Association canadienne des pathologistes National Standards Committee/Immunohistochemistry: Best practice recommendations for standardization of immunohistochemistry tests. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 133, n. 3, p. 354–365, 2010.

WILKINS, M. R. et al. Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. **Electrophoresis**, v. 17, n. 5, p. 830–838, 1996.

WORLD HEALTH ASSEMBLY. Document A60/10. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO: Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. **World Health organization Geneva**, v. 21, n. 83, p. 421–428, 2016.

XAVIER, S. C. et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, v. 2, p. 1–7, 2006.

ZUGEL, U.; KAUFMANN, S. H. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. **Clin.Microbiol.Rev.**, v. 12, n. 0893–8512 (Print), p. 19–39, 1999.

ZURITA, A. I. et al. Cloning and characterization of the *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70(513-663). **J Parasitol**, v. 89, n. 2, p. 372–378, 2003.