

CIBELE FONTES ALVES

**Padronização de um Método Imuno-Histoquímico para
Confirmação da Leishmaniose Tegumentar.**

**Belo Horizonte
2011**

CIBELE FONTES ALVES

**Padronização de um Método Imuno-Histoquímico para
Confirmação da Leishmaniose Tegumentar.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.
Área de concentração: Patologia Geral.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri
Departamento de Patologia Geral ICB/UFMG

Co-Orientadores: Prof. Dr. Pedro Raso - Faculdade de Medicina/ UFMG
Prof^a. Dr^a. Maria Norma Melo - Departamento de Parasitologia ICB/UFMG

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG
2011**



**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
cpg@medicina.ufmg.br



UFMG

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de CIBELE FONTES ALVES, nº de registro 2010652325. Às nove horas do dia **14 de setembro de dois mil e onze**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO IMUNO-HISTOQUÍMICO PARA CONFIRMAÇÃO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR"**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Wagner Luiz Tafuri, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação do seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Wgner Luiz Tafuri/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Pedro Raso/Coorientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Fernando Tobias Silveira	Instituição: UFPA	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Marilene Suzan Marques Michalick	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 14 de setembro de 2011.

Prof. Wagner Luiz Tafuri Wagner Luiz Tafuri

Prof. Pedro Raso Pedro Raso

Prof. Fernando Tobias Silveira Fernando Tobias Silveira

Profa. Marilene Suzan Marques Michalick Marilene Suzan Marques Michalick

Prof. Wagner Luiz Tafuri (Coordenador) Wagner Luiz Tafuri

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Wagner Luiz Tafuri
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Patologia
Faculdade de Medicina/UFMG

Dedico este trabalho à minha amada família e em especial ao Davi, rei do meu coração e ao meu eterno companheiro Floquinho.

Agradecimento especial

Ao Senhor Jair Cecílio de Paula do Ambulatório de Leishmanioses de Caratinga/MG, que contribuiu com dedicação e presteza para o desenvolvimento deste trabalho.

Obrigada pelos ensinamentos e por me fazer acreditar que, com dedicação e trabalho é possível promover saúde em nosso país.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu pai eterno, que está ao meu lado em todos os momentos e que me privilegia com uma vida rica em amores, pessoas especiais e caminhos iluminados. Sinto-me uma filha bajulada por receber, diariamente, tantas bênçãos!

Ao adorável Prof. Wagner Tafuri, símbolo de simplicidade, que, com respeito e atenção, tanto contribuiu para o crescimento desse trabalho. Obrigada por caminhar ao meu lado, passo a passo, para que tudo se concretizasse da melhor e mais honesta forma possível.

À querida Prof^a. Norma, que conquistou de maneira absoluta meu coração, pelo exemplo de profissional competente e brilhante e pelo ser humano afetuoso e sensível. Obrigada pelo apoio e incentivo diários!

Ao Dr. Pedro Raso, grande exemplo de pessoa sábia, que me foi sempre tão presente! Admiro sua postura, sua ética, seu trabalho e me orgulho de ter alguém tão maravilhoso como o senhor para poder me espelhar! Agradeço ao incentivo constante e por sempre estar disposto a mostrar o lado bom da vida e das pessoas...

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia/UFMG, representado por seus coordenadores Prof. Wagner Luiz Tafuri e Prof. Geovanni Cassali, por me proporcionar fazer parte de um programa de qualidade incontestável e de grande enriquecimento científico.

Ao Prof. George Lins Coelho Machado pela colaboração e por proporcionar que parte do projeto contasse com o apoio do Laboratório de Leishmanioses de Caratinga/MG.

Ao Prof. Geovanni Cassali e colegas do Laboratório de Patologia Comparada, pela gentileza e por sempre estarem disponíveis em ajudar.

À Prof^a. Célia Maria Gontijo, pela inestimável contribuição para a elaboração deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Patologia das Leishmanioses (LPL), Belinha, Marta, Vitor, Carol, Aldair, Rodrigo, Igor, Lucélia e Daniel, por serem pessoas bondosas, amigas, unidas e que sempre me trataram com um carinho especial. Saibam que amo todos vocês e estou na torcida para que todos realizem seus anseios profissionais e pessoais! Jaque, Marcela e Natália, que a patologia alcance o coração de vocês, como aconteceu comigo!

À Marta, pela colaboração na execução deste trabalho, pela bondade no coração e por ser sempre tão disponível em repassar seus conhecimentos. Como é bom saber que posso contar com você em todas as horas!

À Belinha, amiga de longa data, que a vida uniu novamente no LPL, obrigada por ser minha adorável confidente. Ao Fábio, pela gentileza diária.

À querida Vânia, pela ajuda contínua, por ter sempre um sorriso no rosto, que tanto cativa e a torna especial.

Ao Laboratório Tafuri de Patologia, por me ensinar a caminhar profissionalmente, ter me acolhido com tanto afeto e disponibilidade, e por consolidar meu amor à patologia. Agradeço pelos conhecimentos adquiridos e pelos amigos que lá fiz.

João e Viviane, vocês são maravilhosos!

Ao Dr. Celso Tafuri, por me tratar como uma filha, pelo incentivo e pelo exemplo de disposição, alegria de viver e de vencer desafios.

Ao querido Alexandre Tafuri, pelos ensinamentos diários, pela paciência de um grande mestre e por transformar a convivência do trabalho em uma amizade eterna!

À Polícia Civil de Minas Gerais, representadas pelo Chefe de Polícia Dr. Jairo Lelis Filho, do Superintendente da Polícia Técnico-Científica Dr. Diógenes Coelho e do Diretor do IML/BH Dr. José Mauro de Moraes. Orgulho-me muito por fazer parte

dessa Instituição, que contribui diariamente para o meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço a essa Instituição por proporcionar o desempenho de minha função de médica legista no Laboratório de Patologia Forense/MG, em que o meu amor à patologia, sob todas as formas, amplifica-se e incentiva-me sempre a estudar, qualificar-me, para o melhor desempenho de meu cargo.

À Dr^a. Daniela Savi, por transbordar alegria de viver, por ter tornado o Laboratório de Patologia Forense/MG, um local de trabalho harmonioso e por ser uma chefe competente, compreensiva e companheira.

Ao Dr. Arnaldo Muzzi, por ter sido um ponto de apoio tão importante na minha vida como médica legista.

Ao Dr. Adilson Savi, pelo carinho e por abrir portas importantes para o meu crescimento profissional.

À Faculdade de Medicina de Itaúna/MG, que me recebeu de braços abertos. À Marli, sempre atenciosa, aos alunos amáveis, às queridas Juliana Mendes e Juliana Becattini e, principalmente, ao Dr. Tolomeu Casali, pela oportunidade e confiança incondicional em minha atuação profissional.

À Superintendência Médica de Saúde Ocupacional, pela experiência profissional e pelos colegas amorosos. Adoro todos vocês!

À querida Alice, grande incentivadora, agradeço pela doçura, atenção e amizade.

À minha amada Mãe, exemplo de força, dedicação e determinação. Agradeço pelo amor incondicional, pelos cuidados, por estar sempre presente e por ser um presente de Deus em minha vida! Obrigada pelo incentivo, pelo esforço em minha educação e por me ensinar os valores de uma vida rica em espírito. Sou absolutamente apaixonada por você e gostaria de ter, pelo menos um pouco, da sua coragem de viver com tanto amor, energia, sem medir esforços para ser feliz... Amo-te incondicionalmente. Sou sua fã! Saiba que viver ao seu lado é condição necessária para minha alegria...

À Cíntia, grande colaboradora, meu braço direito, fiel companheira. Nosso amor, cultivado diariamente, é uma das maiores alegrias da minha vida. Acredito que Deus tenha nos colocado juntas, pois sabia que uma completaria a outra. Obrigada por me apoiar sempre, com brilhantismo, preocupação e sinceridade. Você faz parte de mais essa conquista em minha vida.

À Celminha, ao André e à Melzinha, grandes parceiros de caminhada, obrigada por serem sempre cuidados, amorosos e divertidos. A presença de vocês sempre é motivo de grande alegria em meu coração.

Ao Juninho e à Marina, pelo carinho e atenção.

Aos meus amores: meu afilhado Davi e meu cãozinho Floquinho, que tornaram minha vida mais plena e mais repleta de alegrias! Vocês me ensinaram que o amor independe de formas, de cores, de cheiros, de palavras, pois o amor se basta por ser maravilhoso. Hoje sou uma pessoa mais calma, mais amável, por compreender que, na simplicidade de um olhar, de um sorriso, encontramos o que realmente importa: a felicidade!

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho!

“Há apenas duas maneiras de se ver a vida: Uma é pensar que não existem milagres e a outra é acreditar que tudo é um milagre.”

Albert Einstein

Colaboradores

Este trabalho contou com os seguintes colaboradores:

Prof. George Lins Machado Coelho – Universidade Federal de Ouro Preto- UFOP;

Prof^a. Cíntia Fontes Alves – Universidade de Itaúna – UIT.

Laboratórios Envolvidos no Projeto

Laboratório de Patologia das Leishmanioses (LPL) do Departamento de Patologia Geral do ICB/UFMG;

Laboratório de Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG;

Ambulatório de Leishmanioses de Caratinga/MG.

Financiadores

Este trabalho foi parcialmente financiado por recursos do Projeto de Extensão do Departamento de Patologia Geral – Fundep (Fundação Desenvolvimento da Pesquisa) protocolo 5830-Sub 28.

Comitê de Ética em Pesquisa – UFMG

O Projeto foi aprovado pelo COEP – UFMG, protocolo número 277/11.

Resumo

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), como conhecida nas Américas, trata-se de uma infecção dermatológica resultante da multiplicação intracelular de formas amastigotas de *Leishmania* em células do sistema fagocítico mononuclear. O diagnóstico precoce e correto da LTA é fundamental para o estabelecimento de um tratamento efetivo, porém, os métodos diagnósticos atualmente disponíveis apresentam baixa sensibilidade, custo elevado ou demandam ampla estrutura técnica e laboratorial. Assim, o objetivo principal desse trabalho foi padronizar um método parasitológico imuno-histoquímico para o diagnóstico de certeza da LTA. A padronização baseou-se em um protocolo previamente descrito por TAFURI *et al.*, (2004), na literatura, utilizando-se o método imuno-histoquímico da estreptoavidina peroxidase, que empregou como anticorpo primário, soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum chagasi*. As amostras foram obtidas de 73 pacientes com LTA, não submetidos a qualquer tratamento, procedentes do Ambulatório de Leishmanioses “Dr. Paulo de Araújo Magalhães”, Caratinga/MG, Todos os pacientes apresentavam lesões típicas da forma localizada da LTA, que variou de uma a quatro lesões, localizadas, sobretudo, em áreas expostas do corpo e com tempo de evolução de 15 a 180 dias. Em sua maioria eram lavradores, residentes na zona rural, pertenciam a ambos os sexos e à faixa etária de 16 a 45 anos. Fragmentos de pele obtidos de biópsias cutâneas foram fixados em solução de formol tamponado e incluídos em parafina. Para a visualização da ligação do anticorpo primário com antígenos de espécies de *Leishmania* que causam LTA, utilizou-se o complexo da estreptoavidina peroxidase e um polímero livre de biotina. Como exames complementares ao método imuno-histoquímico proposto, foram realizados estudos histológicos por Hematoxilina e Eosina (HE), imuno-histoquímicos empregando-se anticorpo monoclonal anti-lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania* e a reação em cadeia da polimerase (PCR). As principais alterações histopatológicas apresentadas foram acantose e papilomatose, além de hiperqueratose e paraceratose. Na derme observou-se moderado a acentuado infiltrado inflamatório crônico difuso de células mononucleares, principalmente plasmócitos, macrófagos e linfócitos, além de algumas células gigantes do tipo *Langhans*. Não foi observada reação

granulomatosa típica (granuloma completo) e, em algumas amostras foram identificadas áreas de necrose fibrinoíde. A técnica proposta foi padronizada e as formas amastigotas de *Leishmania* foram facilmente identificadas, com coloração acastanhada, conformação arredondada, em 91,78% dos fragmentos de pele da amostra, sem a ocorrência de coloração de fundo inespecífica (“background”). A técnica padronizada apresentou elevada sensibilidade para a identificação das amastigotas, que ocorreu de forma mais fácil e rápida, quando comparada com a pesquisa do parasito através da coloração pela Hematoxilina e Eosina, com 17,81% de positividade e pela técnica de imuno-histoquímica, que usou anticorpo monoclonal anti-LPG, que apresentou 71,23% de positividade. O resultado da PCR, embora tenha revelado 100% de positividade, não mostrou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao método de imuno-histoquímica ($p=0,7671$). O uso do polímero livre de biotina como sistema de visualização na técnica de imuno-histoquímica, com soro hiperimune de cão infectado, permitiu reduzir de forma notável o tempo de realização da técnica (de 24 horas para 06 horas), sem elevação do custo final da reação. Conclui-se que o método de imuno-histoquímica padronizado, permitiu o diagnóstico de certeza da LTA com, baixo custo, rapidez e fácil execução quando comparado com outras técnicas de imuno-histoquímica e a PCR.

Palavras-Chave: leishmaniose tegumentar americana, patologia, imuno-histoquímica, *Leishmania braziliensis*, diagnóstico.

Abstract

Human Cutaneous Leishmaniasis, in America is known as American Tegumentar Leishmaniasis (LTA), is a cutaneous disease due an infectious agent, a protozoan of genus *Leishmania* where the amastigotes forms are able to multiply inside cells of mononuclear system of vertebrate host. The earlier and definitive diagnostic for LTA is fundamental to define the the patient treatment. At present, the diagnostic methods have shown low sensibility, laborious and time consuming. Thus, the aim of this study was to patronize an immunohistochemical parasitological method to LTA diagnostic. This study was based on another previously published immunohistochemistry method where it uses serum of a dog naturally infected with *Leishmania infantum* as primary antibody anti-*Leishmania*. 73 dermal biopsies samples of patients with LTA, from Caratinga/MG, were fixed in formol buffer solution (10%, pH=7,0) and included in paraffin. Previous parasitological exams were confirmed by positive dermal *imprints* stained by Giemsa and positive Montenegro Intradermal Reaction (IRM) test, All adult patients of both sex, living in rural zone nearest the forest, showed one to four classical cutaneous lesions of LTA, with 15 to 180 days ears old, mainly localized in external regions of the body as members and face. The immunohistochemistry method using serum hiperimune of dogs naturally infected with *Leishmania infantum chagasi* as a primary antibody anti-*Leishmania* was employed in all 73 skin samples. The immune reaction was revealed by the avindin-biotin peroxidase system. In parallel, histological and another immunohistochemistry method using monoclonal antibody anti-lipophosphoglican (LPG) of *Leishmania*, as a primary antibody, and the polymerase chain reaction (PCR) were carried out. The main histological epithelial alterations were acanthosis, papilomatois, hiperkeratosis and parakeratosis. A mononuclear chronic and diffuse exudate composed by plasma cells, macrophages and lymphocytes were observed. In some cases giant cells (Langhans giant cells) could be found, but we did not find a classical granulomatous reaction in any case. The immunohistochemistry method proposal using was patronized because amastigotes forms of *Leishmania* where easily found in 91.78% of the skin biopsies samples without any kind of background. The parasitological diagnosis of LTA carried out the immunohistochemistry method patronized in this work showed higher sensibility than histology in comparison to

Hematoxilin-Eosin analysis with 17.81% positive of cases and immunohistochemistry, using monoclonal anti-LPG with 71.23% positive of cases. PCR method revealed 100% of positive of cases, but these results were not statistical significant than the immunohistochemistry method patronized ($p=0.7671$) here. In addition, we use the polymer system free of biotin in the immunohistochemistry method patronized. It reduced the time consuming of the reaction in at least 06 hours in comparison to the classical protocol. We concluded the immunohistochemistry method patronized to define the parasitological diagnosis for LTA revealed high sensibility, lower time consuming and also less laborious than other diagnostic methods.

Keywords: Human cutaneous leishmaniasis, pathology, immunohistochemistry, *Leishmania braziliensis*, diagnosis.

Lista de Ilustrações

GRÁFICO 1	Frequência de pacientes dos gêneros feminino e masculino, entre os 73 pacientes participantes do estudo, portadores da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).60
GRÁFICO 2	Frequência, por faixa etária, dos 73 pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).60
GRÁFICO 3	Percentual dos 73 pacientes residentes na zona rural e zona urbana, portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).60
GRÁFICO 4	Frequência das atividades laborativas desempenhadas pelos 73 pacientes participantes do estudo, portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).61
GRÁFICO 5	Localização biotopográfica das lesões (n=96) apresentadas pelos 73 pacientes participantes do estudo, portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).61
GRÁFICO 6	Frequência das principais alterações epidérmicas, observadas ao estudo pela microscopia ótica, dos cortes histológicos de 73 fragmentos de pele de pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE).65
GRÁFICO 7	Frequência das principais alterações dérmicas, observadas ao estudo pela microscopia ótica, dos cortes histológicos de 73 fragmentos de pele de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE).65
GRÁFICO 8	Presença de amastigotas nos cortes histológicos de 73 fragmentos de pele de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana, coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE). Amostras negativas (n=60) e positivas (n=13).665
GRÁFICO 9	Percentual de resultados positivos para a pesquisa de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> nos 73 fragmentos de pele (100%), pelos métodos de imuno-histoquímica (IHC) da estreptoavidina peroxidase, utilizando como anticorpo primário: soro hiperimune de cão naturalmente infectado por <i>Leishmania infantum chagasi</i> e anticorpo monoclonal anti- <i>Leishmania lipophosphoglycan</i> (LPG). Teste de Fisher $p=0,129$69
GRÁFICO 10	Carga parasitária dos 73 fragmentos de pele submetidos aos métodos de imuno-histoquímica da estreptoavidina peroxidase, utilizando soro hiperimune de cão naturalmente infectado por <i>Leishmania infantum chagasi</i> e anticorpo (Ac) monoclonal anti- <i>Leishmania lipophosphoglycan</i> (LPG). Teste <i>Mann-Whitney</i> $p=0,0001$70
GRÁFICO 11	Correlação entre a carga parasitária dos 73 fragmentos de pele da amostra submetidos aos métodos de imuno-histoquímica da estreptoavidina peroxidase, utilizando como anticorpo primário: soro hiperimune de cão naturalmente infectado por <i>Leishmania infantum chagasi</i> e anticorpo (Ac) monoclonal anti- <i>Leishmania lipophosphoglycan</i> (LPG). Os índices de Correlação de <i>Spearman</i> $r=0,2941$ valor de $p=0,0001$, são mostrados no gráfico.70

GRÁFICO 12	<p>Frequência de resultados positivos para a presença de <i>Leishmania</i> nos fragmentos de pele de 73 pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana, corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) (17,81%), submetidos à técnica de imuno-histoquímica com soro hiperimune canino (91,78%), imuno-histoquímica (IHQ) com anticorpo monoclonal anti-<i>Leishmania lipophosphoglycan</i> (LPG) (71,23%) e PCR (100%).</p>74
FIGURA 1 A-D	<p><u>Microfotografia de corte histológico de pele de paciente com LTA, Município de Caratinga/MG:</u> (A) Alterações da epiderme com intensa acantose (AC) e papilomatose (PL). Formação de pérola córnea (seta), Barra= 62µm; (B,C) Detalhe da figura anterior mostrando proliferação das células epidérmicas (acantose) e invaginação das papilas (epiderme) na derme. Barra= 32µm; (D) Notar área com retificação da epiderme com retenção de núcleos celulares na camada córnea (setas grandes). Intensa vacuolização das células da camada espinhosa (degeneração hidrópica) (setas pequenas), sendo a morfologia das células espinhosas bem evidenciadas devido ao edema intercelular (cabeça de setas). Barra= 16µm. Ep= Epiderme e De= Derme; Coloração da Hetatoxilina-Eosina (HE).</p>67
FIGURA 2 A-D	<p><u>Microfotografia de corte histológico de pele de paciente com LTA, Município de Caratinga/MG:</u> (A) Observar intenso infiltrado inflamatório crônico e localizado na derme de forma difusa. Bara= 16µm; (B) Detalhe da figura anterior evidenciando o infiltrado inflamatório de células mononucleares (plasmócitos, macrófagos e linfócitos) localizado na derme. Presença de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> no interior de macrófagos (cabeças de seta) Barra= 16µm; (C) Notar a formação de célula gigante do tipo <i>Langhans</i> (seta). Barra= 16µm; (D) Na derme notar fibras colágenas fragmentadas e eosinofílicas tomando o aspecto morfológico da chamada "necrose fibrinóide" (cabeças de seta) Barra= 64µm. Ep = Epiderme e De = Derme. Coloração da Hetatoxilina-Eosina (HE).</p>68
FIGURA 3 A-D	<p><u>Microfotografia de corte histológico de pele de paciente com LTA, Município de Caratinga/MG:</u> (A,B) Método imuno-histoquímico da estreptoavidina peroxidase empregando como anticorpo primário o anticorpo comercial monoclonal anti-LPG de <i>Leishmania</i>. Em (A) notar coloração marrom de fundo (<i>background</i>) no citoplasma das células epiteliais (cabeça de seta). Barra= 32µm. Em (B) detalhe da figura anterior evidenciando o <i>background</i> (cabeça de seta) e a presença de formas amastigotas imunomarcadas, de coloração acastanhada (setas) Barra= 16µm; (C) Método imuno-histoquímico da estreptoavina peroxidase empregando como anticorpo primário soro hiperimune de cão naturalmente infectado com <i>Leishmania infantum chagasi</i>. Barra= 32µm. Em (D) detalhe da figura anterior mostrando as formas amastigotas imunomarcadas, de coloração acastanhada, no interior de macrófagos na derme (setas) Barra= 16µm; Coloração pelo método Imuno-histoquímico da Estreptoavidina Peroxidase contracorado com Hematoxilina de Harris. Epitélio (Ep), Derme (De).</p>71
FIGURA 4 A-D	<p><u>Microfotografia de corte histológico de pele de paciente com LTA, Município de Caratinga/MG:</u> (A,B) Método imuno-histoquímico da estreptoavidina peroxidase empregando como anticorpo primário soro hiperimune de cão naturalmente infectado com <i>Leishmania infantum chagasi</i>. Notar derme papilar (Dep) com presença de macrófagos vacuolizados e parasitados com inúmeras formas amastigotas de <i>Leishmania</i> de coloração acastanhada (imunomarcadas) e ovaladas (setas). Barra=16µm; (B) Derme</p>73

profunda (De) apresentando fibras colágenas fragmentadas e retraídas (alterações artefactuais) com presença de algumas formas amastigotas imunomarcadas localizadas no citoplasma de macrófagos (intracelular) (seta) ou mesmo fora deles no espaço extracelular (cabeça de seta); Barra=16µm. (C) Método imunohistoquímico empregando como anticorpo primário soro hiperimune de cão naturalmente infectado com *Leishmania infantum chagasi*, sendo as formas amastigotas identificadas indiretamente pelo sistema de polímero livre de biotina. Barra= 32µm. (D) Detalhe da figura anterior mostrando as formas amastigotas de coloração acastanhada (imunomarcadas) no interior de macrófagos na derme (setas) Barra= 16µm; (A,B) Coloração pelo método Imunohistoquímico da Estreptoavidina Peroxidase contra corado com Hematoxilina de Harris. (C,D) Coloração pelo método Imunohistoquímico identificado pelo sistema de polímero livre de biotina. Epitélio (Ep), Derme (De).

Lista de Tabelas

TABELA 1	Caracterização dos pacientes da amostra, (n=73), quanto ao gênero, idade, profissão, residência e positividade para os testes de Intradermorreação de Montenegro e pesquisa direta do parasito.58-59
TABELA 2	Características das lesões (n=96) dos 73 pacientes, quanto ao número de lesões, tamanho, localização e tempo de evolução até o atendimento no Ambulatório de Leishmanioses de Caratinga/MG.62-63

Lista de Abreviaturas e Siglas

BSA = Solução de albumina bovina
COEP = Comitê de Ética em Pesquisa
DAB = Diaminobenzidina
ELISA = Ensaio imunoenzimático
HE = Hematoxilina e Eosina
Ig = Imunoglobulina
LTA = Leishmaniose Tegumentar Americana
LV = Leishmaniose Visceral
LVC = Leishmaniose Visceral Canina
M = Molar
mL = Mililitro
mm = Milímetro
NNN = Meio de cultura Novy, McNeal e Nicolle
pb = Pares de base
PBS = Solução de fosfato tamponada
PCR = Reação em cadeia da polimerase
pmol = Picomol
RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta
SFM = Sistema fagocitário mononuclear
WHO = World Health Organization (OMS)
 α -MEM = *Minimum essential medium*
°C = Graus Celsius
 μ L = Microlitro
 μ g = Micrograma
% = Porcentagem

Sumário

1 INTRODUÇÃO/ LITERATURA	22
1.1 Leishmanioses	22
1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	25
1.3 Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	31
1.4 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	35
1.4.1 Diagnóstico laboratorial da LTA	36
1.5 Imuno-histoquímica	40
2 JUSTIFICATIVA	44
3 OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos Específicos	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Pacientes	48
4.2 Critérios de inclusão dos pacientes	48
4.2.1 Teste de Intradermorreação de Montenegro (IRDM)	48
4.2.2 Exame Parasitológico: pesquisa direta do parasito.....	49
4.3 Histologia convencional	49
4.4 Padronização da Imuno-histoquímica – Técnica da estreptoavidina-peroxidase para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana Humana	50
4.4.1 Técnica da imuno-histoquímica	52
4.5 Imuno-histoquímica – Técnica com polímero livre de biotina	53
4.6 Reação da Cadeia de Polimerase (PCR)	54
4.7 Análise Estatística	56
5 RESULTADOS	57
5.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos	57
5.2 Histopatologia	64
5.3 Imuno-histoquímica	69
5.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	74
5.5 Comparação entre o percentual de positividade para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana, entre as técnicas realizadas	74
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÃO	83
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
Anexo 1	95
Anexo 2	96
Anexo 3	97
Anexo 4	101

1 INTRODUÇÃO/ LITERATURA

1.1 *Leishmanioses*

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças, causadas por espécies de protozoários intracelulares obrigatórios, pertencentes ao gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida.

O gênero *Leishmania* engloba protozoários, com ciclo de vida digenético (heteroxênico), que vive alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores (flebotomíneos). Estes últimos são responsáveis pela transmissão dos parasitos de um mamífero a outro. Nos mamíferos, representados na natureza por várias ordens e espécies, os parasitos assumem a forma amastigota, arredondada ou ovalada, apresentando núcleo, cinetoplasto (mitocôndria, com funções especiais), e flagelo interno, imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema fagocitário monocítico (SFM). Os macrófagos parasitados rompem-se liberando os parasitos, capazes de infectar outros macrófagos ou infectar um flebotomíneo. Como atividade importante para maturação de seus ovos, o flebotomíneo fêmea pode se infectar durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, ao ingerir as formas amastigotas fechando o ciclo biológico do parasito (LAINSON E SHAW, 1992; WALTERS, 1993; LACERDA *et al.*, 1994; RASO *et al.*, 1994; GONTIJO *et al.*, 2003).

Uma vez no hospedeiro invertebrado, diferentes formas de promastigotas de *Leishmania* vivem no meio extracelular, na luz do trato digestório, sendo as formas flageladas morfológica e bioquimicamente distintas das formas amastigotas. As promastigotas são alongadas e têm o cinetoplasto situado em sua porção anterior, de onde emerge o flagelo, geralmente mais longo que o corpo. Após quatro a cinco dias do repasto infectante, as promastigotas migram para o aparelho picador-sugador do flebótomo. As formas flageladas, adaptadas à infecção do hospedeiro vertebrado, são as promastigotas metacíclicas, encontradas na probóscida do inseto. Essas formas são de grande motilidade e não aderem à parede intestinal do inseto. Apresentam o corpo menor do que o das outras promastigotas e um flagelo de comprimento, aproximadamente duas vezes o tamanho do seu corpo. Durante a alimentação, o inseto inocula no hospedeiro

vertebrado as formas flageladas, entre elas as promastigostas metacíclicas, que são interiorizadas por um processo de fagocitose induzida, logo se transformando em amastigotas. Essas formas se multiplicam no vacúolo parasitóforo das células fagocitárias do hospedeiro vertebrado, sendo liberadas em consequência da ruptura da célula para serem novamente fagocitadas (KILLICK-KENDRICK, 1990; KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1991).

Os flebotomíneos são representados por dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo (LAINSON E SHAW, 1992; LAINSON *et al.*, 1994; GIL *et al.*, 2003) e estão amplamente distribuídos nos mais diferentes nichos ecológicos (SHAW, 2003), em países onde se encontra a doença (regiões tropicais e subtropicais do Mundo).

A taxonomia de *Leishmania* é complexa. Desde a criação do gênero, o número de espécies tem aumentado significativamente, assim como novos esquemas de classificação têm sido propostos. O gênero *Leishmania* abrange cerca de 30 espécies conhecidas, das quais pelo menos 21 são capazes de infectar o homem e diferentes espécies de animais silvestres e domésticos (ASHFORD, 2000).

Baseado na distribuição geográfica, as leishmanioses podem ser divididas em leishmanioses do Velho Mundo e leishmanioses do Novo Mundo (PAVLI *et al.*, 2010).

Segundo LAINSON E SHAW (1987), as espécies de *Leishmania* encontradas nos mamíferos do Novo Mundo pertencem a ambos os subgêneros de *Leishmania*: *Leishmania* e *Viannia*. No primeiro subgênero, *Leishmania*, estariam as espécies representadas pelas *Leishmania (L.) mexicana* e *Leishmania (L.) amazonensis*, que são responsáveis pela forma cutânea localizada e difusa da doença e *Leishmania (L.) infantum chagasi*, que causa, no Novo Mundo, a leishmaniose visceral. No subgênero *Viannia*, estariam as espécies que causam as formas cutânea e cutâneo-mucosa da leishmaniose tegumentar, e compreendem *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni* e outras espécies de menor dispersão geográfica (LAINSON E SHAW, 1988; RIOUX *et al.*, 1990).

Os hospedeiros vertebrados das espécies de *Leishmania sp.* incluem mamíferos, que vão desde roedores, edentatos, carnívoros até primatas (FURTADO, 1994a). Em função da diversidade e complexidade biológica do

parasito, dos vetores e dos hospedeiros, a leishmaniose apresenta um caráter espectral de manifestações clínicas. Deve-se considerar também, que uma mesma espécie de *Leishmania* pode, eventualmente, determinar uma variada gama de apresentações clínicas, que vão desde formas frustras ou subclínicas, até lesões disseminadas na pele e nas mucosas (BITTENCOURT E BARRAL, 1991; MARZOCHI, 1992).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011) as leishmanioses podem ser divididas basicamente em quatro formas clínicas distintas: cutânea (LC), cutânea difusa (LCD), cutâneo-mucosa (LMC) e visceral (LV).

As leishmanioses representam um problema global de saúde pública, são endêmicas em 88 países dos quais 72 são países em desenvolvimento, sendo de notificação compulsória em apenas 33 desses países. Afetam aproximadamente 14 milhões de pessoas e 350 milhões de pessoas estão sob contínua ameaça da doença. Estima-se que dois milhões de novos casos ocorram por ano, sendo 1,5 milhões de casos de leishmaniose tegumentar e 500.000 casos de leishmaniose visceral (DESJEUX, 2004; GOMES *et al.*, 2008; WHO, 2011).

A importância das leishmanioses reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas graves, com altas taxas de mortalidade, nos casos de leishmaniose visceral (LV) não tratados, e alta morbidade nos casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA), que podem muitas vezes levar a lesões destrutivas e desfigurantes (DEDET E PRATLONG, 2000; GONTIJO *et al.*, 2003).

No Brasil, a doença tem sido assinalada em todos os estados brasileiros, afetando indivíduos de ambos os sexos e de todas as idades (CATALDO *et al.*, 2010). Observa-se um aumento da incidência, tanto da LTA quanto da LV, em todas as regiões geográficas do país, a despeito das medidas de controle tomadas pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2007).

Nos últimos 20 anos, os dados estatísticos oficiais, de casos oriundos de todo o país, apontam para um aumento progressivo da doença, com surtos descritos, configurando ampla endemicidade com nítida expansão geográfica (BRASIL, 2007; CATALDO *et al.*, 2010). De fato, isso seria o resultado da urbanização acelerada e da alteração do meio ambiente, com evidente falta de saneamento básico, situação econômica precária, migração da população para as

periferias das cidades, além de falhas no diagnóstico e tratamento da doença (DUJARDIN *et al.*, 2006; WHO, 2011).

1.2 *Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)*

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), como é conhecida nas Américas, está distribuída desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O foco mais importante é o sul-americano, presente em todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile (OUMEISH, 1999; GONTIJO, *et al.*, 2003). Nas Américas Central e do Sul, as formas tegumentares são causadas por espécies de ambos os complexos: *Leishmania mexicana* e *Leishmania braziliensis* (LAINSON E SHAW, 1987).

Embora exista uma nítida expansão da doença em todo o continente latino-americano, o maior número de casos está concentrado no Brasil e Peru (WHO, 2011).

Trata-se de uma afecção dermatológica que merece grande atenção, principalmente pelas dificuldades terapêuticas, deformidades e sequelas que pode acarretar. A despeito de não ser uma doença letal, e de algumas lesões apresentarem cura espontânea, é uma patologia frequentemente associada a uma significativa morbidade e pode afetar atividades diárias e a vida social de seus portadores, sobretudo quando as lesões estão localizadas nas mãos ou na face (PAVLI *et al.*, 2010).

A doença é considerada uma zoonose primária de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais, edentados e primatas) e acomete o homem e animais domesticados de maneira secundária. O homem representa hospedeiro acidental e parece não ter um papel importante na manutenção dos parasitos na natureza (DESJEUX, 2004; GONTIJO, *et al.*, 2003).

A LTA é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade. Nas Américas, foram encontradas cerâmicas pré-colombianas datadas de 400 a 900 anos d.C, feitas pelos índios do Peru, que apresentavam mutilações de lábios e nariz, hoje conhecidas como leishmaniose cutâneo-mucosa (LAINSON E SHAW, 1988; SANTOS *et al.*, 1994; LAINSON, 1997; CAMARGO *et al.*, 2003).

A primeira referência de LTA no Brasil encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado no livro de Tello, intitulado “Antiguidad de la Syphilis em El Peru”, em que ele relata a viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas Y Quiros, de Tabatinga (AM) até o Peru, percorrendo as regiões do vale amazônico. O primeiro a observar a existência da LTA foi Alexandre Cerqueira, em 1855, no estado da Bahia, identificando-a como botão de Biskra. Em 1895, na Itália, Breda, descreveu a doença em italianos provenientes do estado de São Paulo, Brasil. Em 1908, durante a construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, em São Paulo, ocorreram inúmeros casos, principalmente na cidade de Bauru, ficando a doença conhecida por úlcera de Bauru (BASANO *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2009).

No Brasil, a natureza das lesões cutâneas e nasofaríngeas foi confirmada pela primeira vez, em 1909, por Lindenberg, que encontrou formas de *Leishmania* idênticas à *Leishmania tropica* (WRIGHT, 1903) da leishmaniose do Velho Mundo, em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do estado de São Paulo. Gaspar Vianna, por considerar o parasito diferente da *L. tropica*, o nominou de *L. braziliensis*, ficando assim denominado o agente etiológico da “úlcera de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir” (SILVEIRA *et al.*, 1997; BASANO *et al.*, 2004).

Até a década de 70, no Brasil, todos os casos de LTA eram atribuídos a *L. braziliensis*. Com o aprimoramento das técnicas de identificação de *Leishmania* e intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram descritas. No Brasil foram registradas seis espécies causadoras da LTA (LAINSON *et al.*, 1987; MARZOCHI, 1992; SILVEIRA *et al.*, 1997; BASANO *et al.*, 2004; GRAMICCIA *et al.*, 2005):

(1) *Leishmania (Viannia) braziliensis*: é a espécie mais prevalente no homem e pode causar lesões cutâneas e mucosas. É encontrada em todas as zonas endêmicas do País, desde o norte até o sul, tanto em áreas de colonizações antigas quanto recentes, geralmente associada à presença de animais domésticos e sendo transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos como *Lutzomyia whitmani*, *Lu. wellcomei* e *Lu. intermedia*, dentre outras (LAINSON E SHAW, 1987);

(2) *Leishmania (V.) guyanensis*: causa, sobretudo, lesões cutâneas. Ocorre na margem norte do Rio Amazonas, em áreas de colonização recente, e se associa a edentados e marsupiais. As principais espécies de flebotomíneos envolvidas na

transmissão são a *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani* (LAINSON E SHAW, 1987);

(3) *Leishmania (V.) naiffi*: ocorre na Amazônia, nos estados do Pará e Amazonas, tendo o tatu como reservatório natural. O parasito causa a LTA de evolução benigna e seus principais vetores são a *Lu. squamiventris*, *Lu. paraensis* e *Lu. ayrozai* (SHAW, 1999);

(4) *Leishmania (V.) shawi*: responsável por casos esporádicos no Amazonas e Pará tem como reservatórios vários animais silvestres como macacos, preguiças e procionídeos e como vetor a espécie *Lu. Whitmani*;

(5) *Leishmania (V.) lainsoni*: registrada apenas na Amazônia, tem a paca como animal suspeito de reservatório natural e como vetor a espécie *Lu. ubiquitalis* (SILVEIRA *et al.*, 2004);

(6) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: agente etiológico de LTA, incluindo a leishmaniose cutânea difusa. Seus reservatórios são roedores e marsupiais e a *Lu. flaviscutellata* e *Lu. Olmea*, as principais espécies vetoras (LAINSON & SHAW *et al.*, 1992).

O fato de que apenas poucas espécies do parasito possam infectar e levar ao desenvolvimento da LTA no homem, provavelmente se deve a uma combinação de fatores, incluindo a susceptibilidade intrínseca do homem à infecção e aos hábitos alimentares dos vetores de cada região (SHAW *et al.*, 2003).

A grande maioria das lesões cutâneas encontradas no Brasil é causada por *L. (Viannia) braziliensis* (LAINSON, 1983; LLANOS-CUENTAS *et al.*, 1984; LAINSON E SHAW, 1987; GRIMALDI *et al.*, 1993; GOMES *et al.*, 2008).

As espécies de *Leishmania* são morfologicamente semelhantes, porém, determinadas espécies podem apresentar prognósticos diferentes, durante o curso da infecção. Por exemplo, as úlceras causadas por parasitos do subgênero *Leishmania* geralmente se curam após tratamento ou espontaneamente; as causadas por parasitos do subgênero *Viannia* são mais agressivas e podem recidivar após o tratamento (GRIMALDI *et al.*, 1993; PIRMEZ *et al.*, 1999; RAMOS-E-SILVA *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2008).

A LTA é uma doença polimorfa da pele e das mucosas, que resulta da multiplicação do parasito, em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), normalmente de evolução benigna.

Dependendo da espécie de *Leishmania* infectante e da resposta imune celular do hospedeiro, podem se desenvolver diferentes formas clínicas, convencionalmente conhecidas como: **leishmaniose cutânea localizada** ou **isolada**, **leishmaniose cutâneo-mucosa**, e **leishmaniose cutânea difusa** (MARZOCHI E MARZOCHI, 1994; SILVEIRA *et al.*, 2004; WHO, 2011). Nos últimos anos, um novo padrão clínico foi adicionado ao espectro de manifestações da LTA, caracterizada pela presença de lesões múltiplas e disseminadas, por isso denominada **leishmaniose cutânea disseminada** (SILVEIRA *et al.*, 2004).

A LTA pode se manifestar com uma ou mais lesões, principalmente em áreas expostas do corpo, como a face, membros superiores e membros inferiores, dentro de poucas semanas e, menos frequentemente, meses ou anos após a picada da fêmea do flebotomíneo (D'ÁVILA *et al.*, 2004; PAVLI *et al.*, 2010).

A lesão primária é geralmente única. Eventualmente, múltiplas picadas do flebotomíneo ou a disseminação local podem gerar várias de lesões.

A lesão típica aparece após um período de incubação variável de 10 dias a três meses, inicialmente, como uma pápula eritematosa no sítio da picada, que corresponde ao ponto de inoculação do parasito, evoluindo para um nódulo ou para uma úlcera, que pode persistir por meses ou anos e evoluir espontaneamente para a cura. Acompanha-se de adenopatia regional, com ou sem linfangite, em 12% a 30% dos casos. A úlcera é tipicamente indolor e cresce lentamente. A base é granulosa ou crostosa e as bordas são elevadas. Lesões de pele podem persistir por meses. A forma cutânea localizada raramente progride para a forma disseminada (PAVLI *et al.*, 2010).

A forma **cutâneo-mucosa** é causada por espécies do complexo *braziliensis* como *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*, e, em menor proporção, por outras espécies. Na maioria dos casos está associada à infecção pela *L. braziliensis*, ocorrendo em um intervalo de tempo variável após a instalação da lesão cutânea inicial. Os fatores que contribuem para que uma doença, inicialmente cutânea, evolua para essa forma tardia, não são de todo conhecidos. Entretanto, sabe-se que a demora na cicatrização da lesão primária e o tratamento inicial inadequado contribuem para esta evolução. O acometimento da mucosa pode surgir com a lesão cutânea em atividade, ou anos após sua cicatrização. A forma **cutâneo-mucosa** ocorre em 1-10% dos pacientes que apresentaram a forma isolada da doença, cerca de um a cinco anos após a cura das lesões iniciais.

Acomete a mucosa das cavidades nasal e/ou oral, causando degeneração das cartilagens e dos tecidos moles. Essas lesões são, normalmente, desfigurantes e pode ocorrer a morte em consequência de infecções bacterianas secundárias e desnutrição. Ela induz resposta imune intensa, do tipo hipersensibilidade tardia e as células do SFM das mucosas são pouco parasitadas (ASHFORD, 2000; CUNNINGHAM, 2002; TAVARES *et al.*, 2003; PAVLI *et al.*, 2010).

A LTA **difusa** provoca lesões peculiares, com a formação de nódulos não ulcerados. Os macrófagos são intensamente parasitados, apesar da escassa resposta inflamatória composta predominantemente por células mononucleares e linfócitos. É causada principalmente pelas espécies *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. venezuelensis* e, a infecção está associada a um quadro de anergia do hospedeiro em relação ao parasito. As lesões, em geral, não cicatrizam espontaneamente e são resistentes ao tratamento (ASHFORD, 2000; GONTIJO *et al.*, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2004).

A forma cutânea **disseminada** é causada por espécies do subgênero *Viannia*, principalmente *L. braziliensis*. A disseminação das lesões é rápida, e, em dois a três meses, surgem centenas de lesões pápulo-eritematosas ou ulceradas. Em casos de evolução tardia ou quando os pacientes não são tratados, podem ocorrer lesões simultâneas na pele e nas mucosas. Na histologia, observam-se raros histiócitos e parasitos. A resposta imune celular está preservada, porém, é incapaz de controlar a infecção (SILVEIRA *et al.*, 2004).

No Brasil, há franco crescimento da LTA, devido à manutenção de antigos focos da doença ou áreas próximas a eles e ao aparecimento de surtos epidêmicos, associados a diversos fatores, tais como, o acelerado processo de expansão das fronteiras agrícolas, a implantação de áreas de garimpos, a construção de estradas, o processo de invasão das periferias das cidades (GUERRA *et al.*, 2006).

Atualmente, são detectados cerca de 35 mil novos casos da doença no Brasil, merecendo destaque entre as doenças transmissíveis, tanto pela sua magnitude, quanto pela pouca vulnerabilidade às medidas de controle (MARZOCHI *et al.*, 1992; BRASIL, 2007). Distribuída em todo o território nacional, há registros da enfermidade em todos os Estados da Federação. Basicamente, se apresenta com três perfis (BASANO *et al.*, 2004):

(1) Leishmaniose tegumentar puramente silvestre: ocorre em surtos epidêmicos e está associada à derrubada de matas e à exploração desordenada das florestas, prevalecendo na Amazônia;

(2) Leishmaniose tegumentar silvestre modificada: manifesta-se através de surtos epidêmicos sazonais, em áreas com pequenos focos residuais de mata primária. A infecção prevalece em área peridomiciliar e nas agrícolas, estando ligada às flutuações da densidade populacional dos flebotomíneos. É vista, por exemplo, no Vale do rio São Francisco, Caratinga/MG e Viana/ES;

(3) Leishmaniose tegumentar periurbana: presente sob a forma endemo-epidêmica, endo ou peridomiciliar, em áreas de colonização antiga. Há suspeita da participação de animais domesticados (cães e eqüinos), como em áreas da cidade do Rio de Janeiro.

No Brasil, a LTA acomete principalmente as populações rurais do norte, nordeste e centro-oeste. Estudos mais antigos relatam uma maior incidência em adultos jovens e do sexo masculino. Porém, de acordo com o Ministério da Saúde, houve mudança do perfil. A doença passou a atingir homens e mulheres de maneira quase que uniforme (BRASIL, 2007; MOURA *et al.* 2009).

Na região sudeste do Brasil, a LTA é causada principalmente pela *L. (Viannia) braziliensis*, responsável pelas formas cutânea e cutâneo-mucosa da doença. Há muitas décadas, essa espécie tem se expandido dentro de regiões periurbanas e áreas urbanas, infectando homens, cães e às vezes muare (CATALDO *et al.*, 2010).

Segundo GENARO (1993) entre 1981 e 1991, em Minas Gerais, foi relatado pela Secretaria de Estado de Saúde e pela Fundação Nacional de Saúde a ocorrência de 8.303 casos de LTA. Muitos desses casos afetaram a população rural do norte, nordeste e sudeste do Estado. Merece menção, o aumento da incidência da doença nos últimos anos, em alguns municípios de Minas Gerais (MG). Houve relato da transmissão em áreas periurbanas nos municípios de Belo Horizonte, Divinópolis, Sabará, Ribeirão das Neves, entre outros.

Existe grande dispersão territorial da doença em Minas Gerais. Em algumas regiões foi maior o registro de casos, como na região Metropolitana de Belo Horizonte e em grandes extensões geográficas do leste e norte do Estado. Minas Gerais é o oitavo estado brasileiro em número de casos notificados e o primeiro da

região sudeste na relação de casos/ano. Dos 853 municípios do estado, 401 registraram a ocorrência de transmissão de LTA (SES, 2006).

A forma clínica, da doença, predominante é a cutânea, responsável por 95% dos casos notificados em Minas Gerais, seguida pela forma mucocutânea, em 3% dos casos. A doença ocorre em todas as faixas etárias, mas predomina na faixa de idade compreendida entre 10 a 55 anos, idades consideradas como produtivas e, portanto, sujeitas a maior exposição ao vetor.

Em um estudo realizado em Belo Horizonte/MG, 96% dos casos de leishmaniose cutânea foram atribuídos à *Leishmania (Viannia) braziliensis* e apenas 4% à *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MOURA *et al.*, 2009).

Em certas regiões de Minas Gerais, como no Vale do Rio Doce, o percentual em menores de 10 anos de idade pode chegar a 20%, fato importante para caracterizar a transmissão peridomiciliar (SES, 2010).

Segundo GENARO (1993), no município de Caratinga/MG, localizado no Vale do Rio Doce, a LTA é endêmica. Como se trata de município de colonização antiga, estabelecido em áreas florestais, com o cultivo de café, a manutenção do ciclo de transmissão parece envolver flebotomíneos com hábitos peridomiciliares, tendo roedores e animais domésticos como reservatórios.

1.3 Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

O estudo histopatológico da LTA surgiu com a descrição da doença, no Brasil. Vários autores tentaram correlacionar a histologia com prognóstico, com a eliminação do parasito, com a evolução das lesões e com o quadro clínico e/ou resposta imunológica do hospedeiro (RIDLEY, 1983; MAGALHÃES *et al.*, 1986a; MAGALHÃES *et al.*, 1986b; GUTIERREZ *et al.*, 1991).

O quadro histopatológico da LTA varia desde um infiltrado inflamatório de células mononucleares com neutrófilos de permeio, inespecífico, discreto, moderado a acentuado, até reações granulomatosas com ou sem necrose, sem, no entanto, representar o estágio evolutivo da lesão. Além disso, não pode ser correlacionado, segundo alguns autores, com o prognóstico e nem com a resposta terapêutica (BITTENCOURT E BARRAL, 1991). Tais variações dependem da

virulência da cepa do parasito, do tamanho no inóculo inicial e do perfil imunológico do indivíduo (MEHREGAN *et al.*, 1999).

Nos estudos sobre a histopatologia da LTA, os achados predominantes foram necrose tecidual, em suas diversas expressões morfológicas, e a reação granulomatosa desorganizada (MAGALHÃES *et al.*, 1982; RIDLEY, 1983; MAGALHÃES *et al.*, 1986a; MAGALHÃES *et al.*, 1986b). Nos casos em que é observado principalmente um infiltrado histiolinfoplasmocitário, sem parasitos, o que corresponde à maioria, a plasmocitose constitui um elemento sugestivo (RIDLEY *et al.*, 1980).

O exame histopatológico pode ser útil no diagnóstico diferencial da LTA com doenças que se assemelham clinicamente a essa doença, como a paracoccidiodomicose, hanseníase e neoplasias. Além disso, o estudo histopatológico das lesões cutâneas é relevante para fornecer dados que, associados aos dados clínicos e epidemiológicos, podem sugerir o diagnóstico de leishmaniose (SCHECHTER *et al.*, 1998; D'ÁVILA *et al.*, 2004).

A primeira classificação histopatológica para a LTA foi proposta por AZULAY *et al.* (1960). Em 1978, foi elaborada uma classificação da leishmaniose tegumentar americana considerando três fases histopatológicas: (1) fase granulomatosa, caracterizada por um infiltrado granulomatoso na derme; (2) fase microtuberculóide, caracterizada por pequenas estruturas tuberculóides sem células gigantes e áreas de necrose e células plasmáticas; (3) fase recidivante ou tardia, caracterizada por tubérculos circundados por intenso infiltrado celular, no qual prevalecem linfócitos e histiócitos (NICOLIS *et al.*, 1978).

RIDLEY *et al.* (1980) avaliaram 60 biópsias de pacientes com formas cutânea e mucocutânea de LTA e as classificaram em cinco grupos: (1) grupo I, derme quase normal, exceto pela degeneração do colágeno; (2) grupo II, predomínio de necrose fibrinóide acentuada; (3) grupo III, intenso infiltrado inflamatório na derme, em sua maioria com ausência de necrose e de granuloma; (4) Os Grupos IV e V foram associados à presença de células epitelióides e células gigantes. Os pacientes dos Grupos II e IV representaram casos da forma cutânea, que responderam bem ao tratamento, e os do Grupo III consistiram de 68% da forma cutânea, cuja resposta à terapêutica foi variável, com 55% de recidiva e longa evolução da doença. O autor descreveu as alterações histopatológicas associadas com o prognóstico das lesões e, posteriormente à descrição dos cinco grupos,

acrescentou subgrupos, que fizeram com que o esquema proposto fosse difícil de ser utilizado.

MAGALHÃES *et al.* (1982) estudaram 48 fragmentos de pele de pacientes do município de Três Braços, no Estado da Bahia (BA), Brasil, e, levando-se em conta as classificações propostas previamente, propuseram classificá-la em três grupos, que associavam a classificação histopatológica com o prognóstico da doença. A sugestão de uma nova classificação deu-se porque os autores consideravam complexa a de RIDLEY *et al.* (1980). Essa nova classificação constava de três grupos: (1) grupo necrótico granulomatoso- indicando bom prognóstico; (2) grupo exsudativo- indicando prognóstico misto; (3) grupo tuberculóide- indicando prognóstico reservado.

MAGALHÃES *et al.* (1986a) analisando 162 fragmentos de pele de portadores das formas cutânea e mucocutânea da LTA propuseram outra classificação histopatológica. Nesse estudo, foi feita ainda a associação entre os grupos histologicamente classificados com os dados clínicos, evolução e resposta terapêutica da doença. A classificação histopatológica proposta pelos autores foi: (1) grupo I - reação exsudativa celular; (2) grupo II - reação exsudativa e necrótica; (3) grupo III - reação exsudativa e necrótica-granulomatosa; (4) grupo IV - reação exsudativa e granulomatosa; (5) grupo V - reação exsudativa e tuberculóide. O Grupo IV foi dado como sendo de excelente prognóstico, em que a terapêutica apenas apressava o processo de cura. Os Grupos I, II e III foram considerados de bom prognóstico e a terapia simplesmente reduziu o tempo de cura. O Grupo V teve um mau prognóstico, embora pudesse ter resposta favorável em pacientes jovens. O envolvimento da mucosa nos Grupos I e V correspondeu a um prognóstico desfavorável.

No mesmo ano, MAGALHÃES *et al.* (1986b) analisaram biópsias de pele de 378 pacientes do município de Três Braços (Bahia), infectados com *L. braziliensis*, e notaram que, as alterações dérmicas ou do córion da mucosa, constituíram as modificações mais proeminentes e agruparam as alterações observadas, nos cinco padrões histopatológicos descritos pelos autores, no estudo anterior. Os parasitos, embora escassos, foram encontrados em 63,7% dos casos da forma cutânea e em 37,5% dos casos da forma mucosa. Foi feito um estudo evolutivo em biópsias seqüenciais de 49 dos pacientes da amostra e os autores concluíram que houve mudança no padrão histopatológico. Os autores registraram

que o padrão de reação exsudativa celular constituía o quadro inicial e final da lesão, com os demais padrões aparecendo interpostos durante a evolução da doença.

BITTENCOURT E BARRAL (1991) baseados no trabalho de RIDLEY *et al.* (1980) e MAGALHÃES *et al.* (1986a; 1986b), estabeleceram uma classificação simplificada, com três padrões histopatológicos. Tais padrões foram: (1) infiltrado inflamatório de plasmócitos, linfócitos e macrófagos, na ausência de células epitelióides e de células gigantes; (2) infiltrado inflamatório com a presença de células gigantes e/ou epitelióides, em um arranjo incomum; (3) presença de granulomas circunscritos, bem formados, com células epitelióides e/ou células gigantes associadas ou não aos outros dois padrões. Os autores concluíram que, mesmo utilizando critérios simplificados, em grande número de casos é difícil dizer se os padrões histopatológicos representavam uma particularidade ou um estágio da forma tegumentar, e por isso, não poderiam ser correlacionados com prognósticos e respostas terapêuticas, como sugerido por MAGALHÃES *et al.* (1986a). Além disso, observaram que vários tipos de alterações histológicas podem ser vistas em um mesmo paciente e até mesmo, em uma mesma lesão.

Em um estudo realizado por MORAES *et al.* (1994), pacientes com a forma localizada de LTA, devido a *L. amazonensis* apresentaram, na derme, intenso infiltrado inflamatório de macrófagos vacuolizados, contendo numerosas formas amastigotas. Isto difere da histopatologia dos casos da forma localizada da doença, provocada por *L. braziliensis* e outras espécies do subgênero *Viannia*, que exibe infiltrado difuso de linfócitos e plasmócitos, por vezes, com formação de granulomas epitelióides, além de escasso número de macrófagos parasitados (MAGALHÃES *et al.*, 1986). Esse achado de MORAES *et al.* (1994) na forma localizada é o mesmo encontrado na forma difusa produzida pela *L. amazonensis* (SILVEIRA *et al.*, 1997). Em lesões de portadores da forma mucocutânea causada por *L. braziliensis*, verificava-se abundante número de linfócitos, plasmócitos, poucos macrófagos e escasso número de parasitos (MAGALHÃES *et al.*, 1986a). A avaliação histopatológica de lesões de portadores da forma disseminada da LTA, causada por *L. braziliensis*, apresentou, sobretudo na forma aguda da doença, infiltrado nodular de linfócitos e de plasmócitos, com raros macrófagos e parasitos (SILVEIRA *et al.*, 2004).

BOTELHO *et al.* (1998), realizaram um estudo histopatológico de lesões de pacientes com LTA, procedentes da região de Caratinga/MG, antes e

após o tratamento, até a evolução final para a cura. Foram encontrados 12 padrões histopatológicos, durante toda a evolução da lesão até o processo de cura. Observou-se que, nem sempre a cura clínica era acompanhada pela cura histopatológica e que, em alguns casos, permaneciam lesões dérmicas em atividade, representada pela persistência do processo inflamatório do tipo exsudativo, com ou sem parasitos.

1.4 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

O diagnóstico precoce e correto da LTA é fundamental para o estabelecimento de um tratamento efetivo, evitando o desenvolvimento de uma doença crônica, por vezes com lesões desfigurantes (VAN DER MEIDE *et al.*, 2005).

Diferentes técnicas são utilizadas para o diagnóstico da LTA, e muitas vezes, diferentes métodos são associados para se chegar ao diagnóstico final (MANSON-BAHR, 1987; KAR, 1995; CARVALHO, 2000), como: (1) observação dos sinais e sintomas clínicos e epidemiológicos; (2) detecção do parasito em material de biópsia, com pesquisa direta do parasito em esfregaços de pele, corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa (Giemsa solução a 10%), (3) estudo histopatológico de cortes de fragmentos de pele corados pela Hematoxilina-Eosina (HE); (4) pesquisa indireta do parasito por meio de isolamento em cultura e inoculação em animais susceptíveis como o *Mesocricetus auratus* (hamster); (5) intradermorreação de Montenegro (IDRM); (6) Imuno-histoquímica; (7) imunodiagnóstico, com detecção de anticorpos contra *Leishmania* ou detecção de antígenos do parasito; e (8) detecção do DNA do parasito pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A sensibilidade de cada método diagnóstico pode variar de acordo com a experiência de cada serviço, a qualidade dos equipamentos e insumos utilizados, o tempo de evolução das lesões, as formas clínicas da LTA avaliadas e as diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas na doença (BRASIL, 2007).

Na ocorrência de lesões sugestivas de LTA, o diagnóstico clínico e epidemiológico pode ser suspeitado, especialmente se o paciente procede de áreas endêmicas ou esteve presente em lugares onde há casos de leishmaniose. Entretanto, a confirmação do diagnóstico pela observação do parasito é

fundamental, tendo em vista o número de doenças que, clinicamente podem se assemelhar à LTA, tais como esporotricose, blastomicose, hanseníase, neoplasias. O diagnóstico de certeza da LTA requer a detecção do parasito em sítios de infecção, antes do início do tratamento (MARFURT *et al.*, 2003; BRASIL, 2007; WHO, 2011).

1.4.1 Diagnóstico laboratorial da LTA

É realizado fundamentalmente por três grupos de exames: parasitológicos, imunológicos e moleculares.

Exames parasitológicos

A demonstração do parasito é feita por meio de exames direto e indireto.

a) Demonstração direta do parasito:

Para a pesquisa direta do parasito podem ser utilizados os seguintes procedimentos: biópsia com impressão dos fragmentos de pele em lâmina histológica corada por Giemsa (esfregaço por aposição) e avaliação de cortes histológicos de fragmentos de pele corados pela HE. São procedimentos rápidos, de baixo custo e de fácil execução. Porém, apresentam baixa sensibilidade, em virtude do pequeno número de parasitos encontrados em algumas lesões de pele, e da necessidade de grande habilidade profissional, na identificação das formas amastigotas dos parasitos, por microscopia ótica (ASHFORD, 2000; MARFURT *et al.*, 2003; VAN DER MEIDE *et al.*, 2005).

O achado das formas amastigotas, que resultaria num resultado conclusivo, é mais difícil nos exames histopatológicos, quando comparado aos esfregaços por aposição, uma vez que, os fixadores utilizados de rotina tendem a induzir retração tecidual, diminuindo o tamanho das amastigotas nos tecidos.

A pesquisa do parasito por tais métodos exige um profissional experiente e persistente, pois a chance de encontrar o parasito é diretamente proporcional ao tempo dedicado ao exame de cada lâmina e inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após um ano DE

infecção (FURTADO, 1980; GONTIJO *et al.*, 2003). A sensibilidade dessas técnicas pode ser aumentada pela repetição do exame (MOURA *et al.*, 2009).

b) Isolamento do parasito em cultivo “in vitro” (meios de cultura):

É um método de confirmação do agente etiológico, que permite a posterior identificação da espécie de *Leishmania* envolvida. Os fragmentos cutâneos, obtidos por biópsia da borda da lesão, são inoculados em meios de cultura, sendo o meio bifásico NNN–MacNeal, Novy e Nicolle (ágar-sangue modificado) e outros meios monofásicos como o LIT (Liver Infusion Triptose), frequentemente utilizados. A temperatura de crescimento varia entre 24°C e 26°C, nos quais o parasito cresce relativamente bem. Após o quinto dia, já podem ser encontradas formas promastigotas.

A cultura deve ser examinada e repicada a cada dez dias em novo meio, pelo menos por três vezes e mantida até por um mês sob observação, antes da liberação do resultado negativo. Opcionalmente, pode-se utilizar material obtido diretamente das úlceras por punção com o vacutainer (tubo selado a vácuo), contendo meio de cultura.

As técnicas de cultura são sensíveis, no entanto, são extremamente trabalhosas, demoradas, necessitam de sofisticada estrutura laboratorial e pessoal treinado. Além disso, podem apresentar variações na eficácia entre os diferentes meios de cultura, e o risco de contaminação é um grande problema (MELO, 1982; MARFURT *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2008).

c) Isolamento do parasito “in vivo” (inoculações animais):

O material obtido por biópsia ou raspado de lesão é triturado em solução salina estéril e inoculado via intradérmica, no focinho e/ou patas de hamster (*Mesocricetus auratus*). As lesões no hamster, em geral, desenvolvem-se a partir de um mês. Esses animais devem ser acompanhados por três a seis meses, por vezes, até nove meses, antes da liberação do resultado negativo. Além do longo tempo necessário para a evolução da lesão em modelo animal (média dois a nove meses), a eficácia do isolamento apresenta grande variação quanto à espécie de *Leishmania* (CARVALHO, 2000; BRASIL, 2007).

Exames imunológicos

a) Teste intradérmico (Intraderrmoreação de Montenegro):

Fundamenta-se na visualização da resposta de hipersensibilidade celular tardia. O teste consiste na inoculação intradérmica de 0,1mL de antígeno (preparado com formas promastigotas de *Leishmania*) na face anterior do antebraço do paciente. A leitura é feita delimitando-se e aferindo a área de induração, 48-72 horas após a inoculação. O teste é positivo quando a área de induração é igual ou superior a 05mm (cinco milímetros) de diâmetro.

A Intraderrmoreação de Montenegro (IRM) geralmente persiste positiva, após a cicatrização da lesão cutânea tratada ou curada espontaneamente, pode ser negativa nos indivíduos fraco-reatores e nos precocemente tratados (MONTENEGRO, 1926; CARVALHO *et al.*, 1995; CARVALHO, 2000). Em áreas endêmicas, a IRM positiva pode ser interpretada como leishmaniose anterior ou mesmo aplicação anterior de antígeno de IRM, exposição ao parasito sem doença (infecção), alergia ao diluente do teste ou reação cruzada com outras doenças (Doença de Chagas, esporotricose, hanseníase virchowiana, tuberculose, cromomicose, entre outras). Nas populações de área endêmica, na ausência de lesão ativa ou cicatriz, a positividade varia entre 20 e 30%.

A IRM pode ser negativa nas primeiras quatro a seis semanas após o surgimento da lesão cutânea. Testes repetidos com poucas semanas de intervalo, com finalidade de diagnóstico ou inquéritos epidemiológicos, podem induzir um “efeito reforço”, em que a reação pode se tornar positiva, se realizada em um indivíduo negativo na primeira reação e a segunda é realizada após curto espaço de tempo da primeira. Assim, em ambas as situações, os resultados devem ser interpretados com cautela.

Pacientes com a forma **cutâneo-mucosa** costumam apresentar IRM exacerbada, com vários centímetros de induração e presença de vesiculação no centro da reação, podendo ocorrer ulceração e necrose local. Na forma cutânea difusa e na forma localizada em indivíduos infectados, por *L. amazonensis*, a IRM pode ser negativa (MELO *et al.*, 1977; SOUZA *et al.*, 1992).

Pacientes com LTA e IRM negativa apresentam 3-4 vezes mais risco de recaída, quando comparados com pacientes doentes com IRM positivo (PASSOS *et al.*, 2000).

b) Testes sorológicos

Esses testes detectam anticorpos anti-*Leishmania* circulantes no soro dos pacientes portadores de LTA. Nas formas de leishmaniose cutânea e visceral são utilizados teste de ELISA (Ensaio imunoenzimático) e o teste de RIFI (Reação de imunofluorescência indireta), com antígenos brutos ou recombinantes.

A resposta humoral da LTA é caracterizada por baixos níveis de anticorpos (NASCIMENTO, 2009). Em muitos casos os títulos de anticorpos não são detectáveis ou estão presentes em baixos níveis, além de ocorrer reações cruzadas com outras doenças infecciosas (SALMAN *et al.*, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 2009). Lesões múltiplas, principalmente mucosas, estão associadas a títulos de anticorpos pouco mais elevados.

Relatos de reação falso negativa, em pacientes com LTA e reações positivas encontradas em pacientes com outras doenças, como leishmaniose visceral, Doença de Chagas, pênfigo foliáceo sul-americano, paracoccidiodomicose, esporotricose, ou em indivíduos aparentemente saudáveis, provenientes ou não de áreas endêmicas, fazem questionar o valor potencial dos testes sorológicos em reconhecer casos de LTA, em que não houve demonstração do parasito (FURTADO, 1994b).

Para CAMARGO *et al.* (1969) e KAGAN *et al.* (1974) pode-se valer da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para o diagnóstico da LTA. Esse método apresenta a vantagem da fácil preparação do antígeno e é amplamente utilizado em levantamentos epidemiológicos, para detecção de leishmaniose visceral no homem e em cães (BRAY *et al.*, 1976; POZIO *et al.* 1981; COUTINHO *et al.*, 1985; GRADONI *et al.*, 1988 e GENARO *et al.*, 1991). Contudo, a RIFI apresenta reatividade cruzada com soros de pacientes portadores de outras doenças parasitárias (DA COSTA *et al.*, 1991; CARDOSO e CABRAL, 1998).

O método de ELISA (ensaio imunoenzimático) foi introduzido para diagnóstico da leishmaniose visceral por HOMMEL (1976). Esse método vem sendo utilizado desde então, e vários autores empregam diferentes antígenos, visando à obtenção de maior sensibilidade e especificidade (BADARÓ *et al.*, 1986; REED *et al.* 1990; CABRERA *et al.* 1999). Antígenos brutos são menos específicos e permanece o problema da reação cruzada, principalmente com anticorpos de portadores da Doença de Chagas (DA COSTA *et al.*, 1991; TEIXEIRA *et al.*, 1996).

Exames moleculares: reação em cadeia da polimerase (PCR)

A utilização da biologia molecular, como método de diagnóstico e controle de doenças infecciosas, aumentou significativamente nos últimos anos. Constitui excelente ferramenta, que proporciona meios rápidos e seguros a serem aplicados na taxonomia, na variabilidade genética e no diagnóstico das leishmanioses.

Informações das seqüências de DNA foram muito exploradas, para o desenvolvimento de ensaios baseados na PCR para o diagnóstico de leishmanioses e para a identificação da espécie dos parasitos (BOTELHO *et al.*, 1998; SINGH *et al.*, 2003; TAVARES *et al.*, 2003). Esses ensaios apresentam alta sensibilidade, variando entre 96% a 100%. Todavia, em decorrência do alto custo, risco de contaminação das reações, necessidade de infra-estrutura adequada, laboratórios específicos e da complexidade do processamento das amostras, essas técnicas ainda não encontraram aplicação prática na rotina diagnóstica (DE OLIVEIRA *et al.*, 2003).

1.5 Imuno-histoquímica

As técnicas de imuno-histoquímica (IHQ), para detecção de amastigotas, foram previamente descritas em cães (LIVNI *et al.*, 1983; FERRER *et al.*, 1988; BOURDOISEAU *et al.*, 1997; TAFURI *et al.*, 2004) e no homem (LIVNI *et al.*, 1983; BARBOSA *et al.* 1988; SALINAS *et al.*, 1989; KENNER *et al.*, 1999; QUINTELLA *et al.*, 2009).

Até o final da década de 80, eram poucos os trabalhos de imuno-histoquímica para a detecção de formas amastigotas de *Leishmania*, e não havia relatos que comparassem a técnica de imuno-histoquímica e outros métodos convencionalmente utilizados para o diagnóstico de LTA (SELLS E BURTON, 1981; LYNCH *et al.*, 1986; SALINAS *et al.*, 1989).

KENNER *et al.* (1999) utilizaram a imuno-histoquímica (IHC), para identificar *Leishmania* em tecidos humanos fixados com formalina e incluídos em parafina. Consideraram a IHC, valendo-se de anticorpo monoclonal anti-*Leishmania* – G2D10 - para identificação do parasito, melhor, quando comparada com o método convencional pela Hematoxilina e Eosina (HE). Isso porque, os parasitos eram

identificados mais facilmente à microscopia ótica e com objetivas de menor aumento (X20-40) na IHC, que nos cortes histológicos corados pela HE, que exige o uso da objetiva com óleo de imersão e muita experiência por parte do patologista.

TAFURI *et al.* (2004) descreveram uma técnica de imuno-histoquímica alternativa para o diagnóstico da leishmaniose canina, de elevada eficácia e baixo custo, em relação às imuno-histoquímicas tradicionalmente utilizadas. Essa técnica baseou-se no uso de soro de cão naturalmente infectado por *L. infantum chagasi* como anticorpo primário, seguido por um sistema de detecção, utilizando um anticorpo secundário biotilado de cabra anti-camundongo. O uso do soro hiperimune de cão, como anticorpo primário, quando comparado aos anticorpos monoclonais ou policlonais anti-*Leishmania*, tornou a técnica mais rápida, de menor custo e mais facilmente aplicável. Além disso, o anticorpo secundário utilizado não foi específico para o soro de cão e o resultado ocorreu devido a uma reação cruzada, entre o soro hiperimune de cão infectado por *L. infantum chagasi* e o soro biotilado de cabra anti-camundongo. O método preconizado por TAFURI *et al.* (2004) foi tão específico, quanto aqueles que utilizam anticorpos monoclonais ou policlonais anti-*Leishmania* e foi baixa a ocorrência de coloração inespecífica de fundo (“background”).

SALINAS *et al.* (1989) compararam a sensibilidade e especificidade da técnica de imuno-histoquímica, utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-*Leishmania panamensis*, em lesões de 265 pacientes com a forma cutânea e cutâneo mucosa de LTA. Observaram que a sensibilidade foi elevada, com 61,3% de positividade, para a detecção de formas amastigotas nas biópsias das lesões, sobretudo, naquelas com menos de cinco a seis meses de evolução.

SCHUBACH *et al.* (2001) estudaram comparativamente a positividade para formas amastigotas, em 88 biópsias de pacientes com lesões ativas e lesões cicatriciais de LTA, e lesões ativas e cicatriciais de outras doenças. Foi utilizado o teste de Montenegro, histopatologia, esfregaço por aposição corado pelo Giemsa, RIFI e a imuno-histoquímica, que utilizou como anticorpo, soro hiperimune de coelho anti-*L. braziliensis*. Segundo os autores, o método isolado, que apresentou maior sensibilidade, foi a imuno-histoquímica, com 58,5% de positividade para LTA.

QUINTELLA *et al.* (2009) relataram uma técnica de imuno-histoquímica com soro hiperimune de coelho anti-*Leishmania chagasi*, para o

diagnóstico de LTA, em 30 pacientes com diagnóstico confirmado de LTA por cultura e observaram 70% de positividade com a técnica de imuno-histoquímica, quando comparada a 53% de positividade com o estudo histológico de fragmentos de pele corados pela HE. Entretanto, nos casos avaliados, foi observada uma constante coloração citoplasmática inespecífica em macrófagos e células endoteliais.

A utilização da técnica de imuno-histoquímica tem mostrado sucesso no diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana (WEIGLE *et al.*, 1987; SALINAS *et al.*, 1989; KENNER *et al.*, 1999; SCHUBACH *et al.*, 2001; QUINTELLA *et al.*, 2009). A detecção de amastigotas de *Leishmania*, em cortes fixados por formalina tamponada e incluídos em parafina, tanto de tecidos humanos como em cães, tornou-se rotina, pela sua simplicidade, por não necessitar de equipamentos especiais, e ser altamente sensível e específico (LIVNI *et al.*, 1983; FERRER *et al.*, 1988; BOURDOISEAU *et al.*, 1997; TAFURI *et al.*, 2004).

A imuno-histologia avança os limites da informação diagnóstica obtidos até então pelas chamadas “colorações especiais”, por oferecer maior sensibilidade e especificidade. A introdução da imuno-histoquímica acarretou grande avanço na histopatologia, o que motiva seu uso cada vez mais frequente, para o diagnóstico de doenças infecto-parasitárias (PEREIRA *et al.*, 2008).

A sensibilidade dos testes de imuno-histoquímica depende principalmente do sistema de detecção utilizado, que se baseia na mudança de cor induzida pela enzima ligada a imuno-complexos, vinculados a uma secção de tecido, depois de reagir com seu substrato e o cromógeno (RAMOS-VARA *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2009). O sistema de reconhecimento mais empregado das técnicas de imuno-histoquímica é o da estreptoavidina-biotina peroxidase, que se baseia na afinidade de estreptoavidina pela biotina. A biotina normalmente é ligada a um anticorpo secundário, que se liga a um complexo de estreptoavidina-peroxidase (enzima) para produzir uma reação de cor (RAMOS-VARA *et al.*, 2008).

Recentemente, uma nova geração de técnicas de imuno-histoquímica tem utilizado polímeros livres de biotina, que contém anticorpos secundários e enzimas, capazes de identificar a ligação do anticorpo primário, aos antígenos teciduais, mesmo em baixa concentração. O uso do sistema de polímeros livres de biotina torna a imuno-histoquímica mais rápida, não produz coloração de fundo gerada pela biotina endógena e tem sensibilidade comparável ou às vezes

superior aos métodos de imuno-histoquímica, que utilizam o sistema estreptoavidina-biotina (RAMOS-VARA *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose tegumentar americana (LTA), segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é a apresentação mais comum desta parasitose. Representa cerca de 75% dos casos de leishmanioses no Mundo e constitui grave problema de saúde pública. É a sexta doença infecto-parasitária endêmica, mais importante nas Américas, pela ampla distribuição geográfica, de difícil diagnóstico e com resistência às medidas de controle. É considerada a segunda doença causada por protozoário com relevância médica, superada apenas pela malária.

A sexagésima Assembléia Mundial de Saúde, em 2007, reconheceu que as leishmanioses estão entre as doenças tropicais mais negligenciadas. No Brasil, é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção devido à sua magnitude, e por ser considerada, na maioria dos casos, uma doença de caráter ocupacional (MOURA *et al.*, 2009, WHO, 2011).

A LTA apresenta ampla distribuição com registro de casos em todos os estados brasileiros e é encontrada, sob diferentes perfis epidemiológicos, de acordo com as características biogeográficas da região em questão (BASANO *et al.*, 2004). O número de casos da doença tende a aumentar, devido ao aquecimento global, mudanças na ecologia humana (BAILEY *et al.*, 2007), aumento da detecção da doença associada à síndrome da imunodeficiência humana (HIV/AIDS) (MOLINA *et al.*, 2003), emergência de resistência a drogas anti-*Leishmania* (CROFT *et al.*, 2006), infecção assintomática ou mal diagnosticada (ESCOBAR *et al.*, 1992).

A LTA é uma doença em expansão, com elevada morbidade, contudo, apresenta grandes dificuldades no que se refere a técnicas diagnósticas.

Assim, torna-se importante pesquisar ferramentas, que proporcionem um diagnóstico de certeza da doença, o que permitirá o tratamento rápido e adequado, evitando o desenvolvimento de uma doença crônica, por vezes com lesões desfigurantes (VAN DER MEIDE *et al.*, 2005).

O estigma psicossocial advindo desse agravo é algo ainda não mensurado pelos serviços de vigilância em saúde e, somente aqueles que sofrem suas conseqüências podem senti-las, nem tanto pela dor física, mas pelos danos

psicológicos, sociais e comportamentais impostos pelo caráter deformante dessa doença (SES, 2010).

O diagnóstico de LTA, sobretudo em áreas endêmicas ocorre, principalmente com avaliação clínica e epidemiológica. Um diagnóstico laboratorial definitivo, atualmente, dificilmente é realizado pelos serviços de saúde, e, quando existe, não alcança grande número de pacientes portadores de LTA. Para se atingir um nível satisfatório de resolutividade dos casos de LTA, é necessário garantir apoio do diagnóstico laboratorial dessa patologia. É imprescindível que os serviços de saúde disponibilizem meios para o diagnóstico precoce aos portadores da doença.

A estratégia da OMS, para apoiar países onde a doença é endêmica, é reduzir a incidência das leishmanioses a um nível que permita a cada país integrar as atividades de vigilância e controle da doença, técnica e financeiramente, em atividades de desenvolvimento global de saúde (WHO, 2011). Para alcançar esse objetivo, a OMS considerou a facilitação do diagnóstico precoce e tratamento imediato da LTA, como prioridades a serem abordadas (WHO, 2011).

No Brasil, a terapia específica é frequentemente instituída apenas com base em dados clínicos e epidemiológicos, combinados com um teste de Montenegro positivo (BRASIL, 2007).

Para o diagnóstico definitivo da LTA, é necessária a confirmação parasitológica. No entanto, isso nem sempre é possível, já que *L. braziliensis*, principal espécie envolvida na LTA no país, geralmente não cresce bem em meios de cultura, por vezes apresenta dificuldade em infectar animais experimentais e aparece em pequeno número em esfregaços e cortes histológicos obtidos das lesões (MARSDEN *et al.*, 1986; BARRAL *et al.* 1987).

Devido à dificuldade de encontrar parasitos em lesões ativas (MARSDEN *et al.*, 1986), o diagnóstico indireto da LTA pode ser realizado com base em evidências epidemiológicas, aspectos clínicos, teste de intradermoreação de Montenegro (IRM) e exames sorológicos. A IRM pode ser aplicada em áreas endêmicas da LTA como um índice de transmissão da doença (SOUZA *et al.*, 1992), porém, não distingue infecção de doença ou doença atual de doença prévia, podendo ser negativo em pacientes imunodeprimidos, com a forma difusa da doença ou nos primeiros meses de infecção.

Os resultados de exames sorológicos podem não ser satisfatórios, já que os níveis de anticorpos geralmente são baixos ou negativos (CHIARI *et al.*,

1973), especialmente em pacientes com uma única lesão cutânea recente. Métodos que usam a biologia molecular, apresentam boa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da LTA, porém, têm custo elevado e não estão disponíveis em níveis terciários dos cuidados da saúde, sendo prioritariamente empregados em grandes centros e para projetos de pesquisa.

Diante do exposto, acredita-se que a utilização de uma técnica de imuno-histoquímica de menor custo, alta especificidade e sensibilidade, poderia ser útil para estabelecer um diagnóstico de certeza da LTA em humanos.

Este trabalho propõe-se à padronização de uma técnica de imuno-histoquímica para diagnóstico da LTA, baseada no protocolo descrito por TAFURI *et al.* (2004).

Pretende-se padronizar um método de imuno-histoquímica simples e de fácil execução para a detecção de amastigotas de *Leishmania* em fragmentos de lesões de pele fixados em formalina e incluídos em parafina. Espera-se a identificação das formas amastigotas dentro das células do sistema fagocítico mononuclear na pele de pacientes portadores da LTA. É lícito considerar que, quanto mais precoce o diagnóstico, melhor é a resposta do paciente aos tratamentos disponíveis. Para isso, são necessários métodos de diagnóstico aplicáveis nos centros de saúde, dentro de nossa realidade político-social, levando em conta a praticidade, especificidade e baixo custo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Padronizar um método imuno-histoquímico para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana, baseado na reação cruzada de antígenos de espécies que causam a doença, com soro hiperimune obtido de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum chagasi*.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar a população estudada, quanto à idade, sexo, local de moradia, presença de lesões sugestivas de Leishmaniose Tegumentar Americana, e topografia das lesões;
- ✓ Analisar as principais alterações histopatológicas nos fragmentos de pele, de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana;
- ✓ Realizar a técnica de imuno-histoquímica, utilizando como anticorpo primário, soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum chagasi*, com o complexo da estreptoavidina peroxidase e um polímero livre de biotina, como sistema de identificação da ligação;
- ✓ Realizar a técnica de imuno-histoquímica utilizando como anticorpo primário, anticorpo monoclonal comercialmente disponível;
- ✓ Realizar o diagnóstico molecular da Leishmaniose Tegumentar Americana na pele dos pacientes, através da técnica de reação em cadeia da polimerase convencional;
- ✓ Determinar a densidade parasitária na pele dos pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana;
- ✓ Comparar as técnicas de imuno-histoquímica entre elas e com a de reação em cadeia da polimerase, no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pacientes

A amostra estudada consistiu de 73 pacientes portadores de LTA, atendidos no Ambulatório de Leishmanioses, estabelecido para o diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes, localizado na cidade de Caratinga/MG, situada no sudeste do Brasil, dentro dos limites de 19°19' e 20°01'S e 41°46' e 42°31'W, com uma área de 2234 Km², localizado no Vale do Rio Doce, a 575 metros acima do nível do mar, área endêmica para a LTA (MACHADO-COELHO *et al.*, 1999).

4.2 Critérios de inclusão dos pacientes

Para a participação no experimento, os pacientes poderiam ser de ambos os sexos, ampla faixa etária, que apresentassem lesões com características clínicas de Leishmaniose Tegumentar Americana, que não houvessem sido submetidos a nenhum tratamento prévio, e que, necessariamente, fossem positivos ao teste de Intradermorreação de Montenegro e a pesquisa direta do parasito.

Após consentimento prévio, foram utilizados fragmentos de pele biopsiados da borda das lesões de 73 pacientes, para os procedimentos diagnósticos de rotina e do objeto do trabalho. O prontuário clínico de cada paciente foi minuciosamente analisado, para a caracterização da população e das lesões de pele estudadas.

4.2.1 Teste de Intradermorreação de Montenegro (IRDM)

O antígeno de Montenegro foi produzido sob condições estéreis a partir da cultura de promastigotas do clone I-III-D de *L. amazonensis*, mortas, sonicadas e mantidas em solução mertiolatada 1/10000 (MAYRINK *et al.*, 1993b).

Foi injetado intradermicamente, na face interna do antebraço direito de cada paciente, o volume de 0,1mL do antígeno com 40µg/mL de nitrogênio

(MELO *et al.*, 1977; MAYRINK *et al.* 1993a). A resposta considerada positiva foi indicada pela formação de um nódulo, com diâmetro superior a 05 mm (cinco milímetros), analisado após 48 horas da inoculação do antígeno e aferido por paquímetro, pelo mesmo observador em todos os pacientes.

4.2.2 Exame Parasitológico: pesquisa direta do parasito

O exame parasitológico foi realizado através da pesquisa direta de amastigotas de *Leishmania*, em esfregaços por aposição de biópsias das lesões de pele dos pacientes.

A aposição foi obtida através da compressão do fragmento de pele sobre uma lâmina vítrea, após a retirada do excesso de sangue com papel de filtro. Após a confecção do esfregaço, o material foi fixado em metanol, corado pelo método de Giemsa e examinado ao microscópio óptico, sob imersão (X1000), para a identificação de formas amastigotas.

Os fragmentos de pele biopsiados, que rotineiramente seriam desprezados em descarte adequado, após realização do esfregaço, foram devidamente acondicionados e fixados, para a realização dos estudos histológicos e imuno-histoquímicos do presente trabalho.

4.3 Histologia convencional

Para a execução dos procedimentos precursores da execução das técnicas de histologia, fragmentos de pele dos 73 pacientes, após a realização do esfregaço por aposição em lâmina vítrea, foram acondicionados em frascos de boca larga e fixados em solução de formol tamponado a 10%, pH 7,2, em um volume equivalente a dez vezes o volume de cada amostra de pele. Os frascos devidamente rotulados com a identificação do material, a data da coleta e a codificação de cada paciente, foram transportados do Ambulatório de Leishmanioses de Caratinga/MG, para o Departamento de Patologia Geral do ICB/UFMG, Belo Horizonte, MG.

Os 73 fragmentos de pele foram processados no Laboratório de Técnicas do Departamento de Patologia Geral, em equipamento histotécnico automático, seguindo-se desidratação, diafanização e inclusão em blocos de parafina. Os blocos de parafina, contendo os fragmentos de pele, foram cortados em micrótomo, na espessura de 4µm (quatro micrômetros), montados em lâminas histológicas, corados pela Hematoxilina e Eosina (HE), montados em bálsamo e estudados em microscópio ótico.

Entre as alterações histopatológicas avaliadas, averiguou-se a presença de: (1) epiderme: hiperqueratose, papilomatose, parakeratose, pérolas córneas, úlcera; (2) derme (superficial e profunda): células gigantes, granulomas, tipo do infiltrado inflamatório, neoformação vascular e áreas de necrose. A pesquisa de formas amastigotas, pela microscopia ótica, nos aumentos (X400 e X1000), foi realizada em todos os cortes corados pela HE.

Todas as alterações histopatológicas foram avaliadas de forma semi-quantitativa, levando-se em consideração a extensão das alterações em todo o corte histológico (epiderme e derme conforme especificado acima), sendo assim classificadas:

- Ausência de alterações (1);
- Alterações discretas (2), quando ocupavam menos de 30% da epiderme ou derme;
- Alterações moderadas (3), quando atingiam de 30% a 70% da epiderme ou derme, e;
- Alterações acentuadas (4), quando acometiam mais de 70% da epiderme ou derme.

4.4 Padronização da Imuno-histoquímica – Técnica da estreptoavidina-peroxidase para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana Humana

A padronização da imuno-histoquímica para a pesquisa das formas amastigotas de *Leishmania*, nas biópsias de pele de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana, baseou-se na técnica descrita por TAFURI *et al.* (2004), que emprega soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *L. infantum chagasi*,

rotineiramente utilizada no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). O soro hiperimune foi obtido de seis cães naturalmente infectado por *L. infantum chagasi*, obtidos do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Ribeirão das Neves, mantidos no canil do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG e destinados a experimentos em várias linhas de pesquisa, sobre LVC dos Departamentos de Patologia e de Parasitologia/ICB/UFMG.

Os blocos de parafina contendo os fragmentos de pele foram cortados em micrótomo, na espessura de 4µm (quatro micrômetros) e montados em lâminas previamente desengorduradas com álcool-éter e banhadas em solução gelatinosa de fixação. Para cada amostra, foram confeccionadas quatro lâminas contendo de quatro a cinco cortes cada.

Para a padronização da técnica nos fragmentos de pele humana, foram avaliadas diferentes concentrações dos reagentes e em diferentes tempos de cada etapa da reação, em comparação com aqueles utilizados por TAFURI *et al.* (2004), visando obter a fácil visualização das formas amastigotas, sem a ocorrência de colorações inespecíficas (“background”), empregando, como anticorpo primário, soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *L. infantum chagasi*.

Para a determinação do título do anticorpo primário, foram feitas reações de imuno-histoquímica, com as seguintes diluições do soro hiperimune de cão: 1/25, 1/50, 1/75 e 1/100, em cinco amostras de pele humana dos pacientes incluídos nesse trabalho. Como controle, foram empregado, dois fragmentos de pele de cão, sabidamente positivos e dois fragmentos sabidamente negativos para *L. infantum chagasi*, pertencentes ao arquivo do Laboratório de Patologia das Leishmanioses (LPL) do Departamento de Patologia Geral/ICB/UFMG. A diluição do soro selecionada foi a de 1/50, em que as formas amastigotas foram devidamente identificadas nos fragmentos de pele humana, sem a ocorrência de coloração de fundo.

Foi necessário maior tempo de desparafinização dos fragmentos de pele, sendo realizados, dois banhos de xilol de 30 minutos cada. Além disso, na etapa de desidratação, o tempo de permanência dos cortes, nos banhos de álcool absoluto foi aumentado de seis para 15 minutos.

4.4.1 Técnica da imuno-histoquímica

Foi utilizado o protocolo descrito por TAFURI *et al.* (2004), com modificações. Os cortes histológicos de cada um dos fragmentos de pele, distribuídos em duas lâminas, foram desparafinados em xilol por 60 minutos, hidratados em solução de álcoois decrescentes (álcool absoluto I e II, 90°, 80° e 70°, respectivamente), por três minutos cada e submetidos a um banho por cinco minutos em PBS (Solução de Tampão Fosfato – pH 7,2 e 0,01M). Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, adicionando-se, ao banho de PBS, peróxido de hidrogênio (30 volumes diluídos a 4% em PBS), por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após novo banho de PBS por cinco minutos, as lâminas foram colocadas em solução de bloqueio (12g de leite em pó desnatado, diluídos em 200 ml de PBS) e incubadas em câmara úmida por 30 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado o anticorpo primário (soro hiperimune de cão, naturalmente infectado com *L. infantum chagasi*, na diluição de 1/50 em BSA-soro albumina), em quantidade suficiente para cobrir os cortes histológicos. Em seguida, as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 4°C, por 18 a 24 horas.

Após esse tempo, foi adicionado anticorpo secundário biotilado (soro de cabra anti-camundongo) na diluição de 1/100 (DAKO-LSAB 2, System, Peroxidase-K0675). Novamente as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 20 minutos, à temperatura ambiente. Após os 20 minutos, foram efetuados três banhos de cinco minutos com PBS. Em seguida, foi adicionado o complexo estreptoavidina peroxidase, e incubado por 20 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente, seguido de dois banhos de PBS, de cinco minutos cada. A reação foi revelada utilizando-se solução de Diaminobenzidina (DAB) a 0,024% em PBS, acrescida de solução de peróxido de hidrogênio 40 volumes a 0,16% em PBS, por cinco minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, por três segundos e lavados em água corrente, por 10 minutos. Posteriormente, procedeu-se a desidratação em alcoóis crescentes (70°, 80°, 90°) por um período de três minutos cada um e cinco minutos e 10 minutos, respectivamente, em álcool absoluto I e II. Depois de secados, os cortes foram cobertos com Entellan[®], e recobertos com lamínula, para posterior análise em microscópio ótico.

Para cada bateria de 20 lâminas, foram utilizados como controles negativos, um corte de pele de cão e de pele humana, ambas seguramente negativas para *L. infantum chagasi*, e um corte de pele de cão e outro humana, seguramente positivas para as formas amastigotas de *Leishmania*. Como controle negativo da reação, substituiu-se o anticorpo primário por PBS/BSA e como controle negativo para peroxidase, foi substituído o anticorpo secundário por PBS/BSA.

Em paralelo à padronização da imuno-histoquímica, foram realizadas, também em duplicata, reações de imuno-histoquímica em cortes histológicos das amostras de pele, empregando como anticorpo primário, anticorpo monoclonal anti-*Leishmania* lipophosphoglycan (LPG), comercialmente disponível (Cedarlane Laboratories[®], Canadá), na diluição de 1/100, segundo a técnica descrita por SELLS E BURTON (1981).

Depois de realizadas as técnicas de imuno-histoquímica utilizando, como anticorpo primário, soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *L. infantum chagasi* e anticorpo monoclonal anti-LPG de *Leishmania*, com o complexo da estreptoavidina peroxidase, foi realizada a quantificação da carga parasitária nos cortes histológicos, para comparação da sensibilidade entre as duas técnicas para o diagnóstico da LTA. A quantificação foi efetuada em microscópio óptico, com a objetiva de (X40), avaliando-se 20 campos aleatórios de um dos cortes histológicos de cada fragmento de pele pertencente à amostra.

4.5 Imuno-histoquímica – Técnica com polímero livre de biotina

Nos fragmentos de pele da amostra, foi realizada nova técnica de imuno-histoquímica, que empregou como anticorpo primário, soro de cão naturalmente infectado por *L. infantum chagasi*, nas mesmas concentrações utilizadas após padronização, como descrita no *item 4.4*, e como sistema de identificação da ligação anticorpo com antígenos de *Leishmania*, um polímero livre de biotina (DAKO Advance HRP[®] – K 4068).

Até a aplicação do anticorpo primário, a execução da técnica se deu como descrito no *item 4.4*. (soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *L. infantum chagasi* na diluição de 1/50 em BSA-soro albumina). Porém, depois de adicionado o soro hiperimune de cão, em quantidade suficiente para cobrir os cortes

histológicos de pele (50µl), as lâminas foram incubadas por uma hora em câmara úmida, à temperatura ambiente. Após o tempo descrito, foi aplicado o Advance link HRP® sobre os cortes histológicos nas lâminas, que foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, foram efetuados dois banhos de cinco minutos com PBS e adicionado o polímero livre de biotina (Advance Enzyme HRP®). Após nova incubação por 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente, foram repetidos dois banhos de PBS de cinco minutos cada. A reação foi revelada, utilizando-se solução de Diaminobenzidina (DAB) a 0,024% em PBS, acrescida de solução de peróxido de hidrogênio 40 volumes a 0,16% em PBS, por cinco minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris, por três segundos e lavadas em água corrente, por cinco minutos. As lâminas foram desidratadas em alcoóis crescentes (70°, 80°, 90° álcool absoluto I e II) por um período de três minutos. Depois de secadas, as lâminas foram cobertas com Entellan®, entre lâmina e lamínula e armazenadas, para posterior análise em microscópio ótico.

Os fragmentos de pele submetidos a esse método foram analisados ao microscópico ótico (X200-400) e os resultados comparados com a técnica padronizada, descrita no item anterior.

4.6 Reação da Cadeia de Polimerase (PCR)

Para a extração do DNA dos fragmentos de pele incluídos em parafina, empregou-se o Kit “NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL), com modificações.

Para cada reação, foi utilizado como controle negativo, um fragmento de pele humana negativo para LTA e, como controle positivo, 1ng de DNA extraído de cultura de *Leishmania braziliensis*, cepa MHOM/BR/75/M2904. Na reação, foram usado iniciadores específicos para o kDNA de espécies do complexo *Leishmania (Leishmania) braziliensis*, que amplificam um fragmento de 750 pares de bases (pb) (DE BRUIJN *et al.*, 1992). As reações foram realizadas em um volume final de 10µL contendo 1µL de DNA, 50mM de KCl, 0,2mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs) (Promega, EUA), 1,5mM de MgCl₂, 10mM de Tris-HCl pH 8,3, 1U de Taq DNA polimerase (GIBCO, USA) e 10pmoles de cada iniciador: B1(5'

GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG 3') e B2 (5'CTAATTGTGCACGGGGAGG 3') de acordo com o descrito por DE BRUIJN *et al.* (1992).

As reações foram realizadas em um termociclador PTC-100 (MJ Research, EUA). As condições ótimas para a amplificação do DNA foram as seguintes: desnaturação inicial a 96°C por seis minutos, seguida por 26 ciclos de desnaturação a 93°C por 30 segundos, anelamento a 67,5°C por um minutos e extensão a 72°C por um minuto (DE BRUIJN *et al.*; 1992).

Evitou-se a contaminação da reação, ao usar diferentes ambientes para: extração do DNA, amplificação e análise dos produtos amplificados, além da descontaminação das áreas de trabalho.

- **Análise dos produtos amplificados**

Os produtos amplificados pela PCR foram analisados por eletroforese em géis de poliacrilamida não desnaturante na concentração de 5%, impregnados pelo nitrato de prata (SAMBROOK *et al.*, 1982).

Foi utilizado um marcador de massa molecular de 100pb (Promega, EUA). Em cada canaleta do gel, foi aplicada uma alíquota de três microlitros do produto de amplificação, diluída em mesmo volume de tampão da amostra 2X (0,5% de azul de bromofenol, 0,5% de Xileno-cianol, 60% de glicerol). A corrida eletroforética foi realizada a 80-100volts por três horas, com migração de dois centímetros do corante. Após a eletroforese, os géis foram transferidos para a solução fixadora (etanol absoluto 10%, ácido acético 0,5%) durante 10 minutos e revelados pela impregnação com 0,1% de nitrato de prata, diluído em solução fixadora por 10 minutos, sob agitação lenta. Posteriormente, foram lavados em água destilada, seguido da redução dos sais de prata com 3% (p/v) de hidróxido de sódio e 0,3% de formaldeído a 37%, até a visualização das bandas. Quando completa, a revelação foi interrompida com a solução fixadora e os géis fotografados para documentação.

4.7 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com os programas computacionais PRISM 5 e GRAPH PAD e os testes *Mann-Whitney*, Teste de *Fisher* e Teste de *Spearman*. Em todos os casos, a diferença estatística foi considerada significativa quando o valor de $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos

As amostras estudadas foram procedentes de 73 pacientes que procuraram espontaneamente o ambulatório de leishmanioses de Caratinga/MG, para avaliação clínica. Todos tiveram o diagnóstico de LTA, sendo que 42 (57,50%) pertenciam ao gênero masculino e 31 (42,50%) ao feminino (GRÁF. 1; TAB. 1).

A faixa etária variou entre um e 78 anos; média de 33,82 anos. A maioria (41,10%) tinha entre 31 e 45 anos de idade e 27,40% possuíam entre 16 e 30 anos (GRÁF. 2; TAB. 1).

Em relação à moradia, 69 (94,52%) residiam em zona rural e quatro (5,48%) em zona urbana. Destes, um residia em zona urbana, mas desempenhava suas atividades laborativas em zona rural (GRÁF. 3; TAB. 1).

Dentre as atividades laborativas, destacam-se aquelas ligadas diretamente à agropecuária, já que 36 (49,30%) dos pacientes eram lavradores, seguida pela ocupação doméstica desempenhada por 17 (23,30%) deles (GRÁF. 4).

Quanto às lesões cutâneas, os 73 (100%) pacientes apresentaram lesões de pele típicas da LTA, distribuídas da seguinte maneira: 57 (78,08%) pacientes tinham única lesão, 11 (15,07%) duas lesões, dois (2,74%) três lesões e três (4,11%) pacientes exibiram quatro lesões. O tamanho médio das lesões apresentadas pelos pacientes, em um total de 96 lesões, foi de 18,90mm diâmetro e predominavam nas regiões corporais mais frequentemente expostas, ou seja: membros inferiores (39,60%); membros superiores (37,50%) e face (10,42%); foram também observadas lesões no tórax (5,21%), abdômen (4,17 %) e região lombar (1,04 %) (TAB. 2).

Pela avaliação da anamnese descrita nos prontuários dos pacientes, constatou-se que, o intervalo de tempo entre o surgimento das lesões até a procura de atendimento no Ambulatório de Leishmanioses de Caratinga/MG, variou entre 15 e 180 dias, com uma média de 50,5 dias. Em 10, o tempo do surgimento das lesões foi superior a 90 dias (TAB. 2).

TABELA 1

Caracterização dos pacientes da amostra, (n=73), quanto ao gênero, idade, profissão, residência e positividade para os testes de Intradermorreação de Montenegro e pesquisa direta do parasito.

CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES						
Paciente	Sexo	Idade	Profissão	Residência	Teste de Montenegro	Pesquisa direta
1	M	78	Aposentado	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
2	M	14	Estudante	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
3	M	13	Estudante	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
4	F	16	Lavradora	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
5	F	27	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
6	M	37	Operador de máquina	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
7	F	32	Lavradora	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
8	F	50	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
9	F	49	Lavradora	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
10	F	28	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
11	F	25	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
12	F	18	Lavradora	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
13	M	44	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
14	F	12	Lavradora	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
15	M	13	Estudante	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
16	M	55	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
17	M	16	Estudante	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
18	M	16	Estudante	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
19	M	36	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
20	F	35	Lavradora	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
21	F	44	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
22	F	21	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
23	M	40	Lavrador	Área urbana	POSITIVO	POSITIVA
24	F	38	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
25	M	57	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
26	M	16	Lavrador	Área urbana	POSITIVO	POSITIVA
27	M	17	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
28	M	52	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
29	M	22	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
30	M	19	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
31	M	33	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
32	M	29	Lavrador	Área urbana	POSITIVO	POSITIVA
33	M	36	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
34	M	48	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
35	M	38	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA

TABELA 1

(Continuação) Caracterização dos pacientes da amostra, (n=73), quanto ao gênero, idade, profissão, residência e positividade para os testes de Intradermorreação de Montenegro e pesquisa direta do parasito.

CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES						
Paciente	Sexo	Idade	Profissão	Residência	Teste de Montenegro	Pesquisa direta
36	M	42	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
37	M	41	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
38	F	41	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
39	F	44	Auxiliar de saúde	Área urbana	POSITIVO	POSITIVA
40	F	47	Auxiliar de saúde	Área urbana	POSITIVO	POSITIVA
41	F	1	Sem profissão	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
42	M	10	Estudante	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
43	M	45	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
44	M	37	Operador de máquina	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
45	M	32	Estofador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
46	F	34	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
47	M	14	Estudante	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
48	F	42	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
49	F	34	Lavradora	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
50	M	22	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
51	M	24	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
52	F	39	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
53	F	69	Aposentada	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
54	M	67	Aposentado	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
55	M	11	Estudante	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
56	F	44	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
57	F	10	Estudante	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
58	F	17	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
59	M	53	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
60	F	33	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
61	M	35	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
62	M	33	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
63	M	25	Vaqueiro	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
64	F	48	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
65	F	33	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
66	M	52	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
67	F	37	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
68	M	63	Aposentado	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
69	F	23	Lavradora	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
70	M	42	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
71	M	55	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
72	M	26	Lavrador	Área rural	POSITIVO	POSITIVA
73	F	20	Do lar	Área rural	POSITIVO	POSITIVA

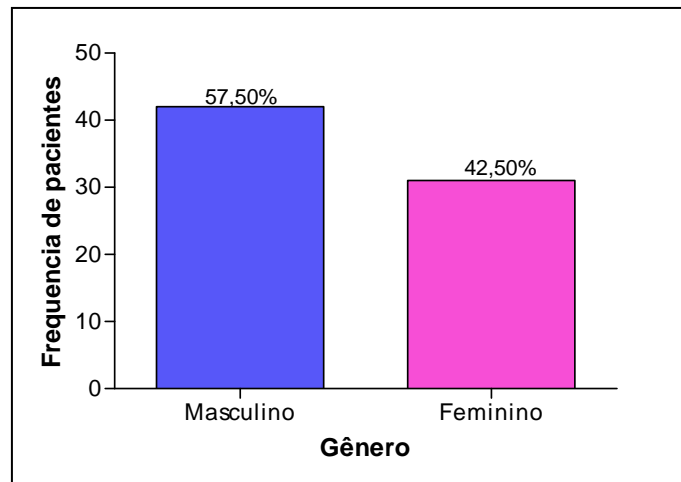


GRÁFICO 1 - Frequência de pacientes dos gêneros feminino e masculino, entre os 73 pacientes participantes do estudo, portadores da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

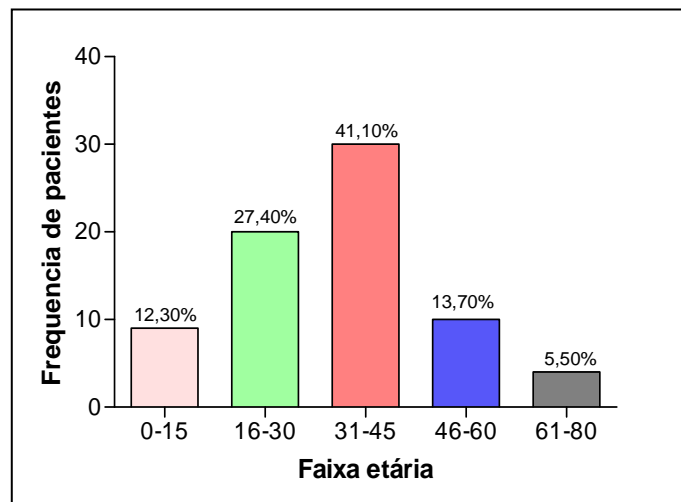


GRÁFICO 2 - Frequência, por faixa etária, dos 73 pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

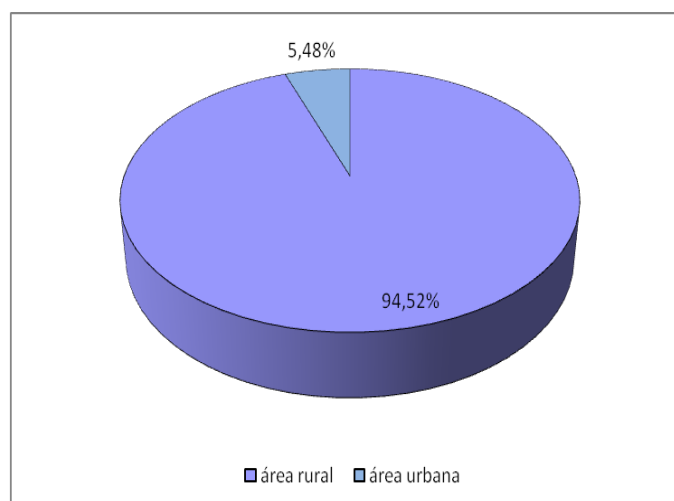


GRÁFICO 3 - Percentual dos 73 pacientes residentes na zona rural e zona urbana, portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

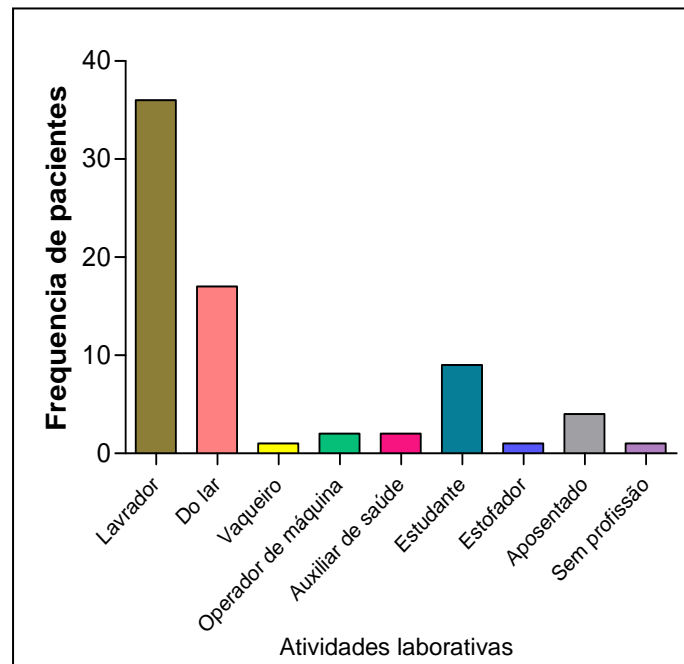


GRÁFICO 4 – Frequência das atividades laborativas desempenhadas pelos 73 pacientes participantes do estudo, portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

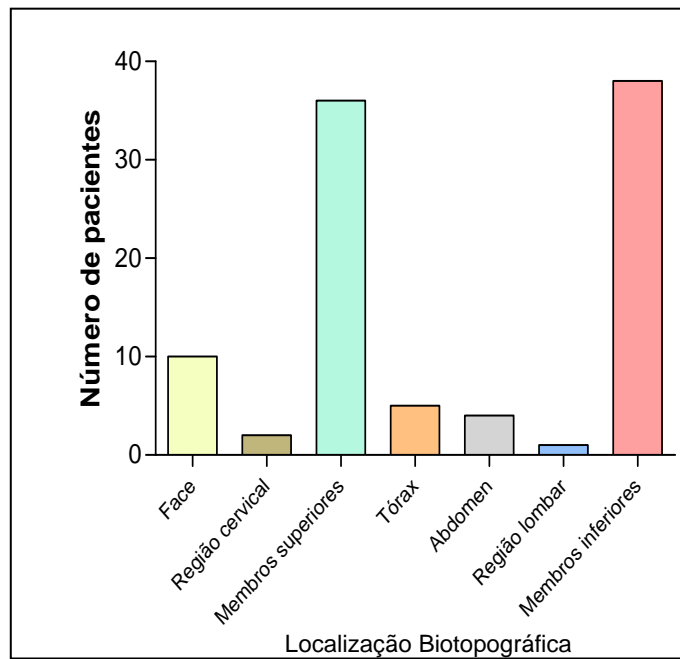


GRÁFICO 5 Localização biotopográfica das lesões (n=96) apresentadas pelos 73 pacientes participantes do estudo, portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

TABELA 2

Características das lesões (n=96) dos 73 pacientes, quanto ao número de lesões, tamanho, localização e tempo de evolução até o atendimento no Ambulatório de Leishmanioses de Caratinga/MG.

CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES				
PACIENTE	NUMERO	TAMANHO	LOCALIZAÇÃO	EVOLUÇÃO
1	1	12 X 12 mm	Membro superior esquerdo	30 dias
2	2	08 X 08 mm	Tórax e membro superior direito	60 dias
3	1	07 X 07 mm	Face	40 dias
4	1	05 X 05 mm	Membro superior esquerdo	30 dias
5	2	12 X 12 mm	Membros inferiores	60 dias
6	4	10 X 08 mm	Região cervical e membro superior direito	90 dias
7	4	15 X 15 mm	Face e membro superior esquerdo	15 dias
8	1	22 X 17 mm	Membro superior esquerdo	45 dias
9	1	13 X 03 mm	Membro inferior esquerdo	45 dias
10	1	15 X 11 mm	Membro superior esquerdo	60 dias
11	1	10 X 10 mm	Membro inferior direito	60 dias
12	1	13 X 13 mm	Membro superior direito	30 dias
13	4	20 X 15 mm	Membro superior direito e membro inferior esquerdo	60 dias
14	1	20 X 15 mm	Face	45 dias
15	1	05 X 05 mm	Membro inferior direito	30 dias
16	1	05 X 05 mm	Membro superior direito	90 dias
17	1	18 X 18 mm	Membro superior direito	45 dias
18	2	15 X 13 mm	Membro superior direito	45 dias
19	1	16 X 16 mm	Membro inferior esquerdo	20 dias
20	1	35 X 26 mm	Membro superior direito	35 dias
21	1	08 X 08 mm	Membro inferior esquerdo	30 dias
22	1	11 X 11 mm	Face	90 dias
23	1	30 X 30 mm	Membro inferior direito	30 dias
24	1	09 X 09 mm	Membro superior esquerdo	15 dias
25	1	30 X 30 mm	Membro superior direito	45 dias
26	1	10 X 10 mm	Membro inferior esquerdo	25 dias
27	1	30 X 25 mm	Abdomen	30 dias
28	1	10 X 10 mm	Membro superior esquerdo	25 dias
29	1	15 X 15 mm	Face	60 dias
30	1	11 X 11 mm	Face	30 dias
31	1	20 X 15 mm	Membro superior esquerdo	60 dias
32	1	60 X 60 mm	Membro inferior direito	60 dias
33	1	13 X 12 mm	Região lombar	30 dias
34	1	12 X 08 mm	Membro superior direito	45 dias
35	1	15 X 12 mm	Tórax	60 dias

TABELA 2

(continuação)

Características das lesões (n=96) dos 73 pacientes, quanto ao número de lesões, tamanho, localização e tempo de evolução até o atendimento no Ambulatório de Leishmanioses de Caratinga/MG.

CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES				
PACIENTE	NUMERO	TAMANHO	LOCALIZAÇÃO	EVOLUÇÃO
36	1	11 X 11 mm	Abdomen	30 dias
37	1	16 X 10 mm	Membro inferior direito	30 dias
38	1	35 X 25 mm	Membro inferior esquerdo	90 dias
39	2	16 X 15 mm	Face e membro superior esquerdo	30 dias
40	1	15 X 13 mm	Membro superior direito	30 dias
41	1	11 X 11 mm	Membro superior direito	30 dias
42	1	15 X 15 mm	Membro inferior direito	50 dias
43	2	14 X 12 mm	Membro inferior esquerdo	45 dias
44	2	32 X 30 mm	Membro inferior direito	60 dias
45	1	22 X 15 mm	Membro inferior direito	60 dias
46	1	32 X 26 mm	Membro superior direito	60 dias
47	2	17 X 17 mm	Membros inferiores	30 dias
48	2	70 x 40 mm	Membros inferiores	120 dias
49	1	32 X 14 mm	Membro inferior direito	25 dias
50	3	22 X 20 mm	Membros inferiores	30 dias
51	1	32 X 25 mm	Membro inferior direito	120 dias
52	1	35 X 25 mm	Membro superior direito	60 dias
53	1	38 X 25 mm	Membro superior esquerdo	40 dias
54	1	12 X 12 mm	Membro superior direito	180 dias
55	1	15 X 15 mm	Membro superior direito	30 dias
56	1	13 X 11 mm	Região cervical	30 dias
57	1	18 X 15 mm	Membro inferior direito	120 dias
58	1	12 X 10 mm	Membro superior direito	35 dias
59	2	10 X 10 mm	Tórax	40 dias
60	1	06 X 06 mm	Membro superior direito	20 dias
61	1	11 X 08 mm	Membro superior esquerdo	30 dias
62	1	35 X 30 mm	Face	60 dias
63	2	09 X 08 mm	Membro inferior esquerdo	90 dias
64	1	17 X 15 mm	Membro superior esquerdo	30 dias
65	3	40 X 20 mm	Abdomen e membro superior direito	30 dias
66	2	25 X 10 mm	Tórax e membro inferior esquerdo	60 dias
67	1	25 X 21 mm	Membro inferior esquerdo	60 dias
68	1	30 X 30 mm	Membro inferior direito	120 dias
69	1	10 X 10 mm	Membro inferior direito	60 dias
70	1	15 X 05 mm	Face	30 dias
71	1	30 X 29 mm	Membro inferior direito	30 dias
72	1	11 X 11 mm	Membro inferior direito	60 dias
73	1	11 X 11 mm	Face	60 dias

5.2 Histopatologia

As principais alterações epidérmicas encontradas nos fragmentos de pele foram: hiperqueratose e acantose de grau moderado a acentuado em 89,04% dos casos (escore 3 a 4); papilomatose discreta a moderada em 73,97% (escore 2 a 3) e acentuada em 20,55% (escore 4). A parakeratose discreta a moderada ocorreu em 69,86% (escore 2 a 3) e de grau acentuado em 16,44% (escore 4), a formação de pérolas córneas ocorreu em 43,84% dos casos (GRÁF. 6), (FIG. 1A-D).

O infiltrado inflamatório moderado a acentuado (escore 3 a 4) predominantemente de mononucleares (plasmócitos, macrófagos e linfócitos) ocorreu em 87,67% dos casos, sendo que em 13,33% dos casos observou-se discreta infiltração de linfócitos e plasmócitos perivascular ou em pequenos focos. A presença polimorfonucleares ocorreu em 28 (38,36%) dos fragmentos de pele estudados. Em 26,03% foram observadas células gigantes do tipo *Langhans* e/ou do corpo estranho, dos quais 5,5% havia formação granulomatosa incompleta. Não foram observados granulomas típicos (granulomas circunscritos, bem formados, com células epitelióides e/ou células gigantes associadas). Áreas de necrose estavam presentes em 41,1% dos casos e, neoformação vascular, de grau discreto a moderado (escore 2 a 3), em 76,71% dos casos (GRÁF. 7), (FIG. 2A-D).

A visualização de formas amastigotas, nos cortes histológicos corados pela HE, por microscopia ótica (X400 ou X1000) ocorreu em 13 amostras, equivalendo a 17,81% de positividade (GRÁF. 8).

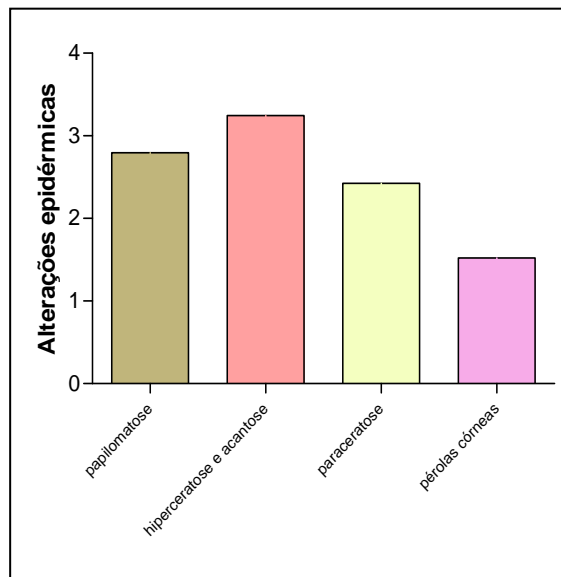


GRÁFICO 6 Frequência das principais alterações epidérmicas, observadas ao estudo pela microscopia ótica, dos cortes histológicos de 73 fragmentos de pele de pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE).

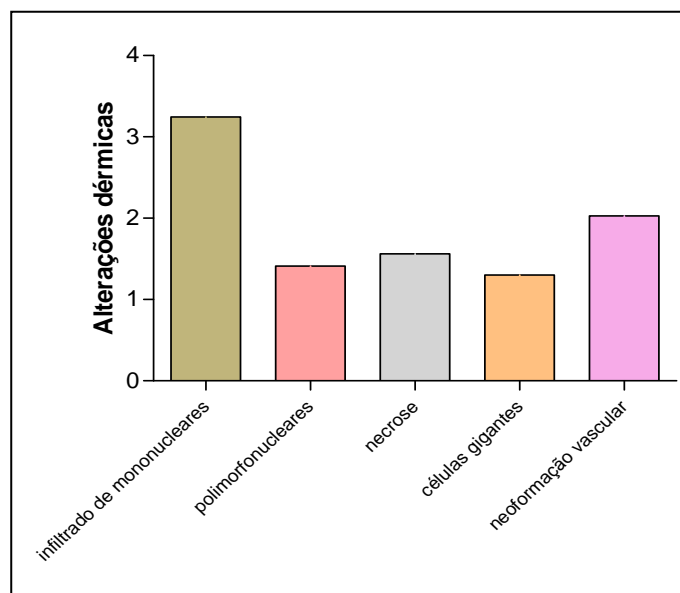


GRÁFICO 7 Frequência das principais alterações dérmicas, observadas ao estudo pela microscopia ótica, dos cortes histológicos de 73 fragmentos de pele de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE).

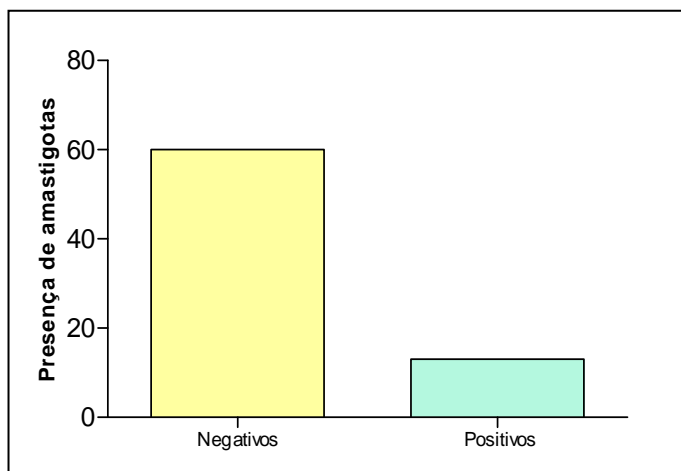


GRÁFICO 8 - Presença de amastigotas nos cortes histológicos de 73 fragmentos de pele de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana, coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE). Amostras negativas (n=60) e positivas (n=13).

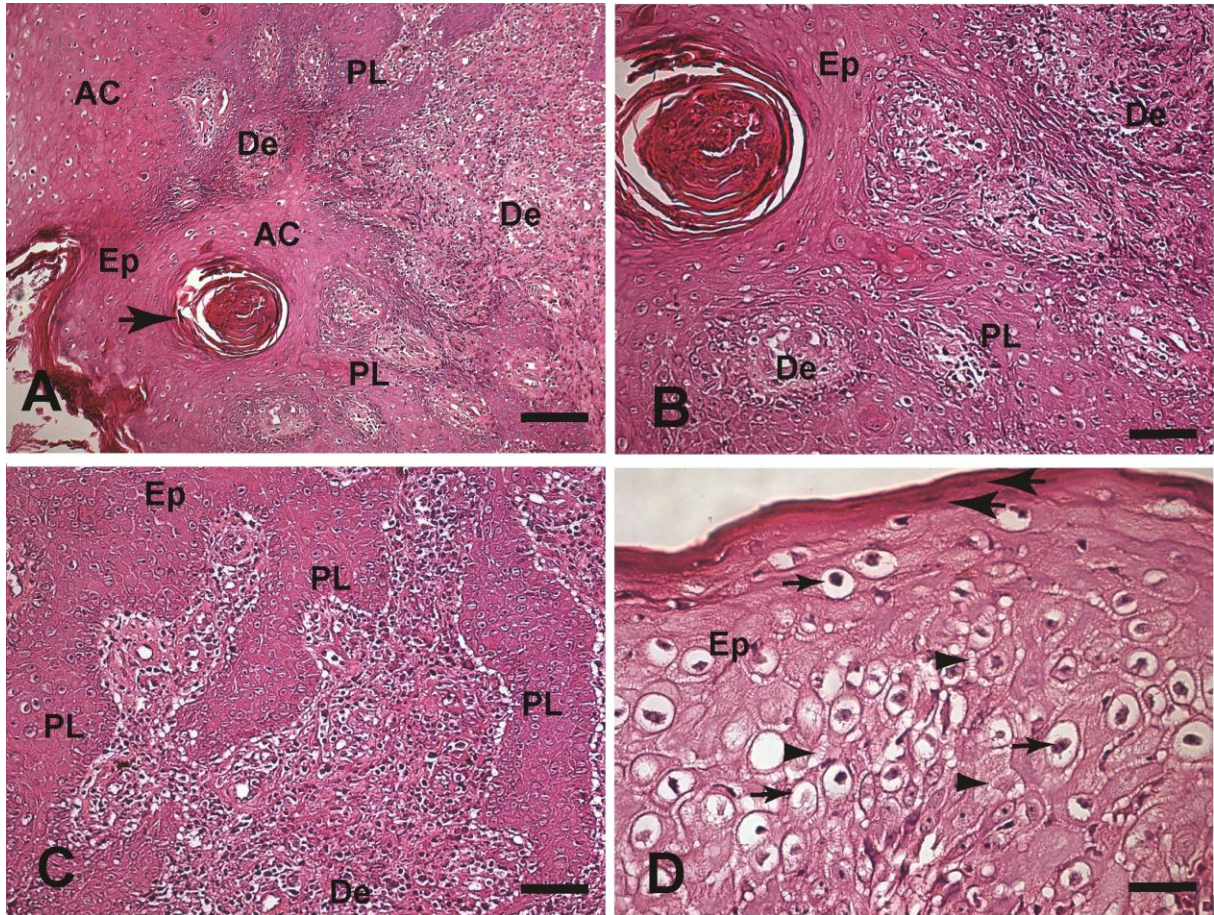


Figura 1A-D: Microfotografia de corte histológico de pele de paciente com LTA, Município de Caratinga/MG: (A) Alterações da epiderme com intensa acantose (AC) e papilomatose (PL). Formação de pérola córnea (seta), Barra= 62 μ m; (B,C) Detalhe da figura anterior mostrando proliferação das células epidérmicas (acantose) e invaginação das papilas (epiderme) na derme. Barra= 32 μ m; (D) Notar área com retificação da epiderme com retenção de núcleos celulares na camada córnea (setas grandes). Intensa vacuolização das células da camada espinhosa (degeneração hidrópica) (setas pequenas), sendo a morfologia das células espinhosas bem evidenciadas devido ao edema intercelular (cabeça de setas). Barra= 16 μ m. Ep= Epiderme e De= Derme; Coloração da Hetatoxilina-Eosina (HE).

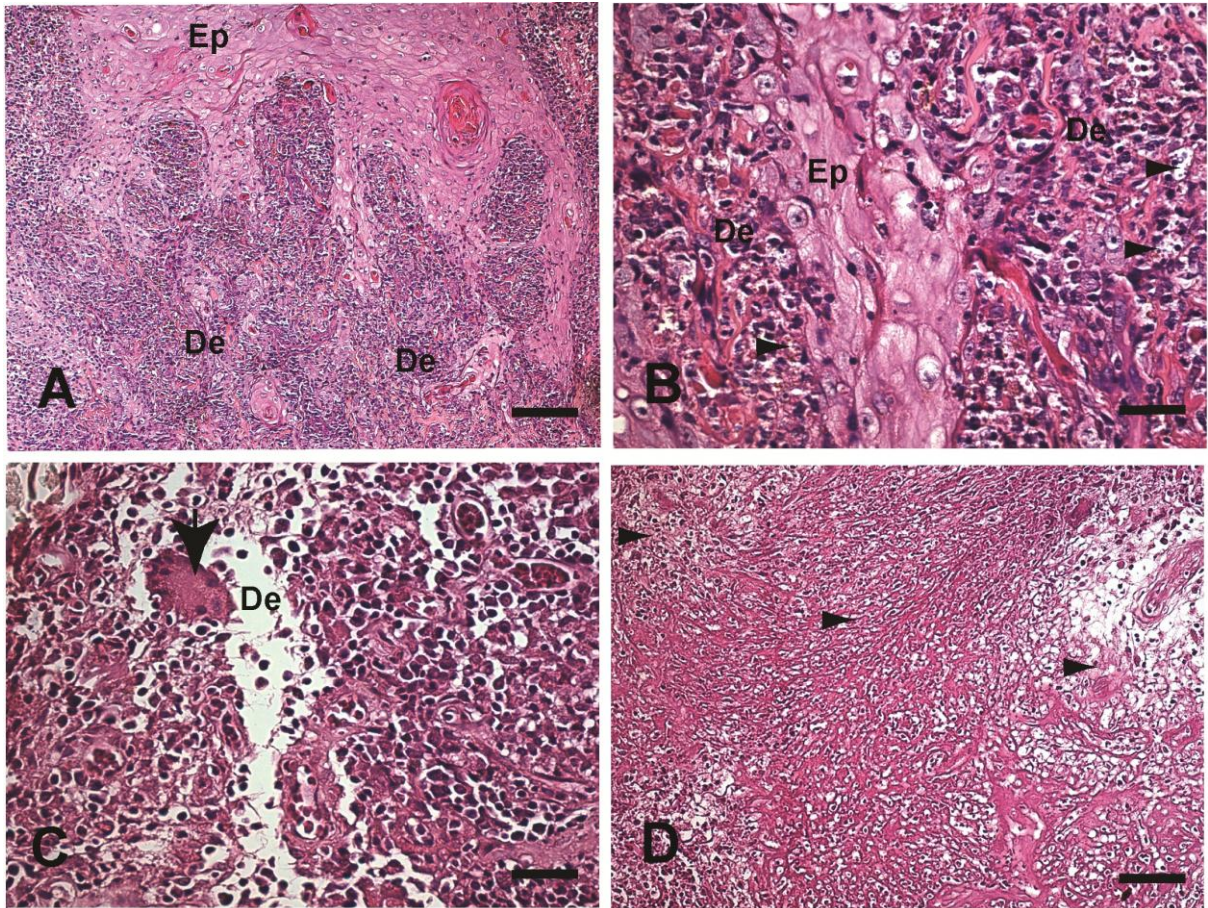


Figura 2A-D: Microfotografia de corte histológico de pele de paciente com LTA, Município de Caratinga/MG: (A) Observar intenso infiltrado inflamatório crônico e localizado na derme de forma difusa. Barra= 16 μ m; (B) Detalhe da figura anterior evidenciando o infiltrado inflamatório de células mononucleares (plasmócitos, macrófagos e linfócitos) localizado na derme. Presença de formas amastigotas de *Leishmania* no interior de macrófagos (cabeças de seta) Barra= 16 μ m; (C) Notar a formação de célula gigante do tipo *Langhans* (seta). Barra= 16 μ m; (D) Na derme notar fibras colágenas fragmentadas e eosinofílicas tomando o aspecto morfológico da chamada “necrose fibrinóide” (cabeças de seta) Barra= 64 μ m. Ep = Epiderme e De = Derme. Coloração da Hetatoxilina-Eosina (HE).

5.3 Imuno-histoquímica

Utilizando a técnica de imuno-histoquímica que empregou como anticorpo primário, soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *L. infantum chagasi* e o protocolo descrito por TAFURI *et al.* (2004), com modificações, em 67 (91,78%) dos 73 fragmentos de pele da amostra, houve a marcação das formas amastigotas. O parasito foi observado, sobretudo no interior de macrófagos, na derme superficial e profunda (FIG. 3A–D).

O resultado da técnica de imuno-histoquímica utilizando como anticorpo primário, anticorpo monoclonal anti-*Leishmania lipophosphoglycan*, comercialmente disponível (Cedarlane Laboratories[®], Canadá), para o diagnóstico da LTA, para comparação com a técnica padronizada, revelou a presença de formas amastigotas em 52 fragmentos (71,23%) (GRÁF. 9).

O número de formas amastigotas de *Leishmania* identificadas pela técnica de imuno-histoquímica padronizada nesse trabalho, foi significativamente superior ($p < 0,05$), quando comparado ao número de formas amastigotas do parasito identificadas pela técnica de imuno-histoquímica, que utiliza como anticorpo primário, anticorpo monoclonal comercial (GRÁF. 10).

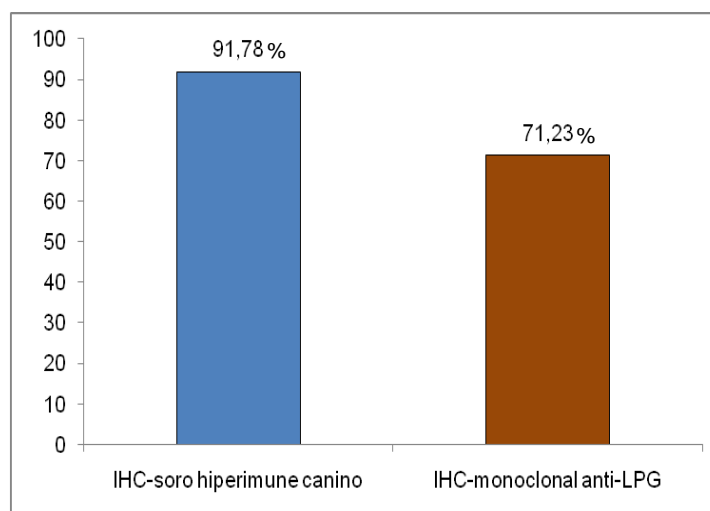


GRÁFICO 9 – Percentual de resultados positivos para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* nos 73 fragmentos de pele (100%), pelos métodos de imuno-histoquímica (IHC) da estreptoavidina peroxidase, utilizando como anticorpo primário: soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum chagasi* e anticorpo monoclonal anti-*Leishmania lipophosphoglycan* (LPG). Teste de Fisher $p = 0,129$.

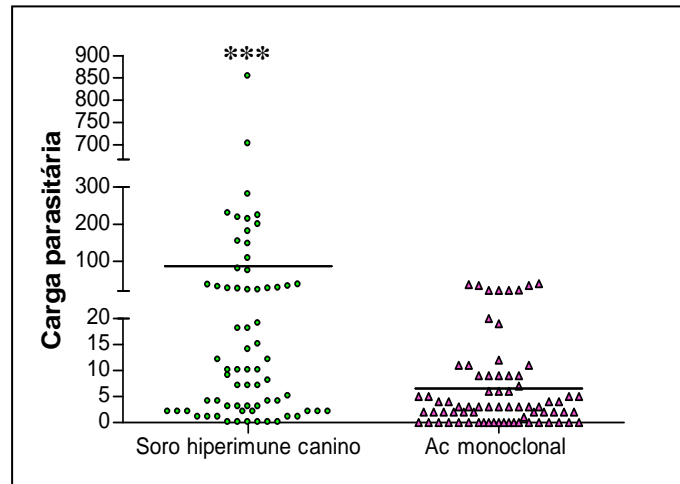


GRÁFICO 10 - Carga parasitária dos 73 fragmentos de pele submetidos aos métodos de imunohistoquímica da estreptoavidina peroxidase, utilizando soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum chagasi* e anticorpo (Ac) monoclonal anti-*Leishmania lipophosphoglycan* (LPG). Teste *Mann-Whitney* $p=0,0001$.

Foi encontrada correlação positiva ($r=0,2941$) e significativa ($p=0,0001$), entre a carga parasitária nos fragmentos de pele dos pacientes com LTA determinada pelos métodos imuno-histoquímicos, utilizando como anticorpo primário soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *L. infantum chagasi* e anticorpo comercial anti-*Leishmania lipophosphoglycan* (LPG) foi encontrada conforme observada no Gráfico 11.

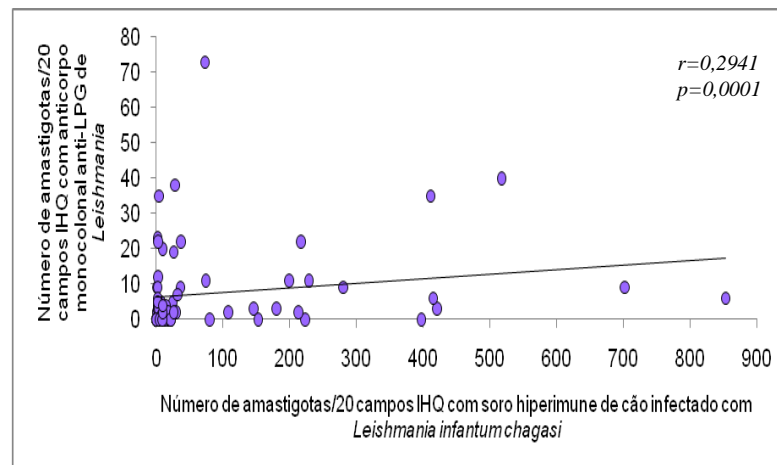


GRÁFICO 11 – Correlação entre a carga parasitária dos 73 fragmentos de pele da amostra submetidos aos métodos de imunohistoquímica da estreptoavidina peroxidase, utilizando como anticorpo primário: soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum chagasi* e anticorpo (Ac) monoclonal anti-*Leishmania lipophosphoglycan* (LPG). Os índices de Correlação de *Spearman* $r=0,2941$ valor de $p=0,0001$, são mostrados no gráfico.

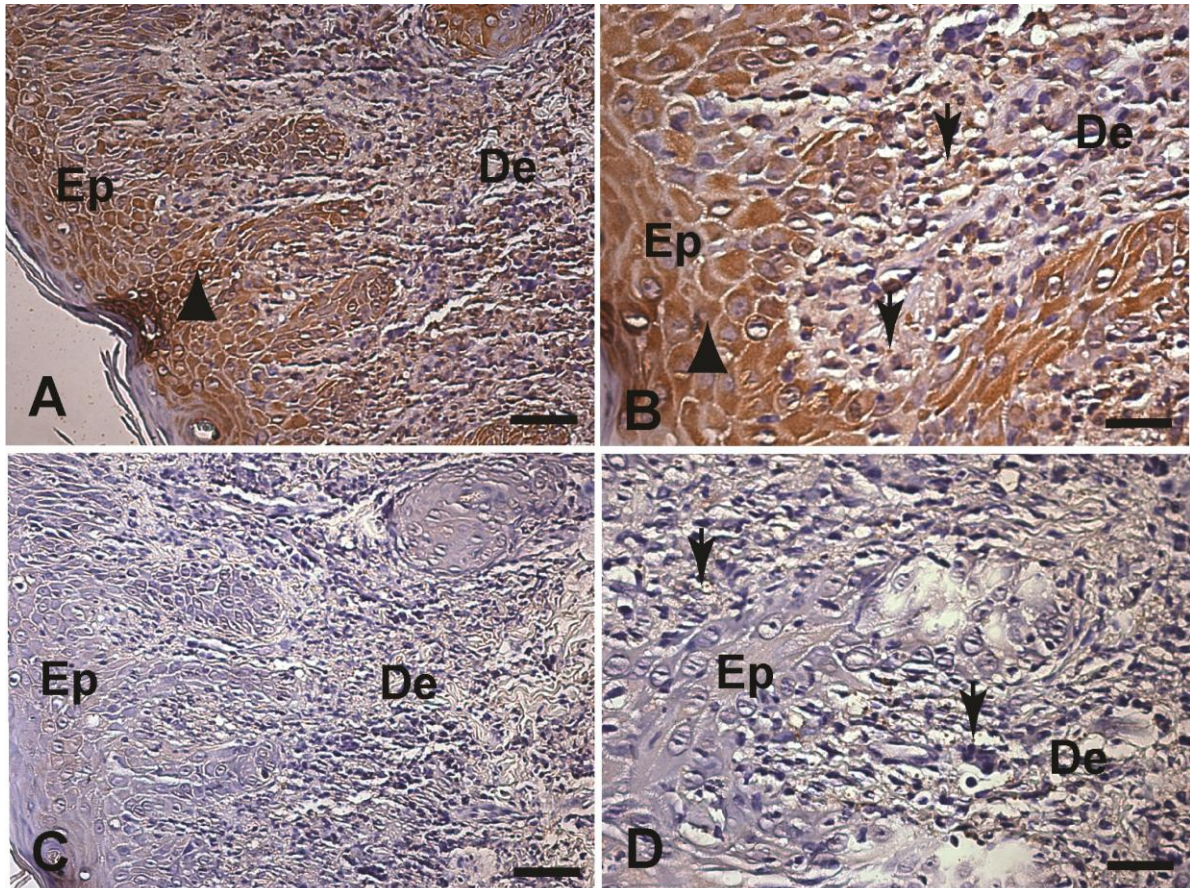


Figura 3A-D: Microfotografia de corte histológico de pele de paciente com LTA, Município de Caratinga/MG: (A,B) Método imuno-histoquímico da estreptoavidina peroxidase empregando como anticorpo primário o anticorpo comercial monoclonal anti-LPG de *Leishmania*. Em (A) notar coloração marrom de fundo (*background*) no citoplasma das células epiteliais (cabeça de seta). Barra= 32 μ m. Em (B) detalhe da figura anterior evidenciando o *background* (cabeça de seta) e a presença de formas amastigotas imunomarcadas, de coloração acastanhada (setas) Barra= 16 μ m; (C) Método imuno-histoquímico da estreptoavina peroxidase empregando como anticorpo primário soro hiperimune de cão naturalmente infectado com *Leishmania infantum chagasi*. Barra= 32 μ m. Em (D) detalhe da figura anterior mostrando as formas amastigotas imunomarcadas, de coloração acastanhada, no interior de macrófagos na derme (setas) Barra= 16 μ m; Coloração pelo método Imuno-histoquímico da Estreptoavidina Peroxidase contracorado com Hematoxilina de Harris. Epitélio (Ep), Derme (De).

O método de imuno-histoquímica que empregou o polímero livre de biotina (DAKO Advance HRP® – K 4068) apresentou a mesma sensibilidade da técnica, padronizada neste trabalho. Os seis fragmentos de pele da amostra que se apresentaram negativos para as formas amastigotas de *Leishmania* através da técnica de imuno-histoquímica padronizada mantiveram negativos pela técnica que utilizou o polímero livre de biotina (FIG. 4A-D).

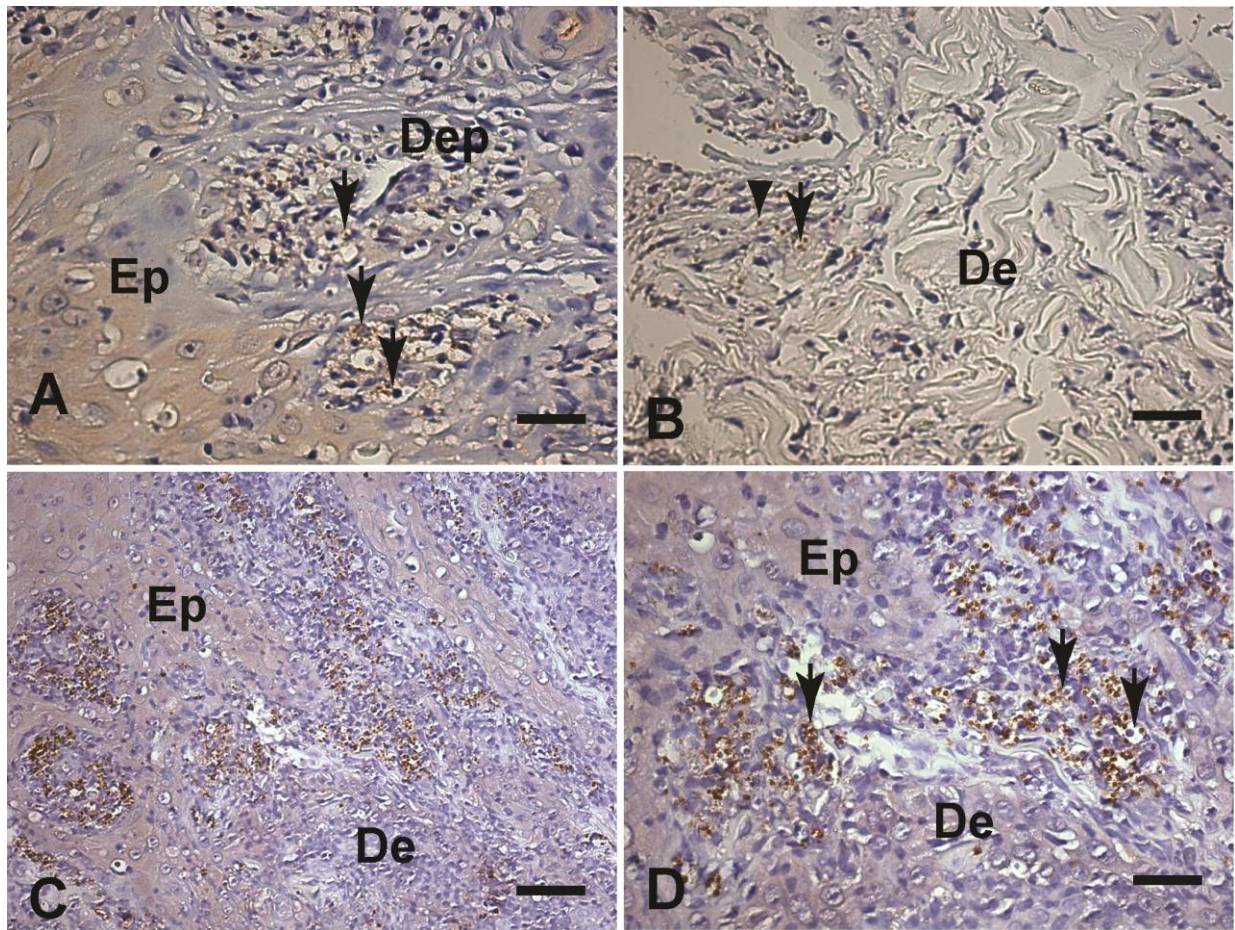


Figura 4A-D: Microfotografia de corte histológico de pele de paciente com LTA, Município de Caratinga/MG: (A,B) Método imuno-histoquímico da estreptoavidina peroxidase empregando como anticorpo primário soro hiperimune de cão naturalmente infectado com *Leishmania infantum chagasi*. Notar derme papilar (Dep) com presença de macrófagos vacuolizados e parasitados com inúmeras formas amastigotas de *Leishmania* de coloração acastanhada (imunomarcadas) e ovaladas (setas). Barra=16µm; (B) Derme profunda (De) apresentando fibras colágenas fragmentadas e retraídas (alterações artefactuais) com presença de algumas formas amastigotas imunomarcadas localizadas no citoplasma de macrófagos (intracelular) (seta) ou mesmo fora deles no espaço extracelular (cabeça de seta); Barra=16µm. (C) Método imuno-histoquímico empregando como anticorpo primário soro hiperimune de cão naturalmente infectado com *Leishmania infantum chagasi*, sendo as formas amastigotas identificadas indiretamente pelo sistema de polímero livre de biotina. Barra= 32µm. (D) Detalhe da figura anterior mostrando as formas amastigotas de coloração acastanhada (imunomarcadas) no interior de macrófagos na derme (setas) Barra= 16µm; (A,B) Coloração pelo método Imuno-histoquímico da Estreptoavidina Peroxidase contra corado com Hematoxilina de Harris. (C,D) Coloração pelo método Imuno-histoquímico identificado pelo sistema de polímero livre de biotina. Epitélio (Ep), Derme (De).

5.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Todos os 73 fragmentos de pele dos pacientes em estudo, submetidos à técnica de PCR apresentaram resultado positivo. Não houve diferença estatisticamente significativa na capacidade de determinar a presença de *Leishmania* entre a técnica de imuno-histoquímica padronizada (91,78%) e a técnica de PCR (100%), ($p=0,7671$).

5.5 Comparação entre o percentual de positividade para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana, entre as técnicas realizadas

O GRÁF. 12 resume a frequência de resultados positivos para a presença de *Leishmania*, mostrada por cada uma das técnicas aplicadas às 73 amostras de pele de pacientes portadores de lesões de LTA, provenientes de Caratinga, MG.

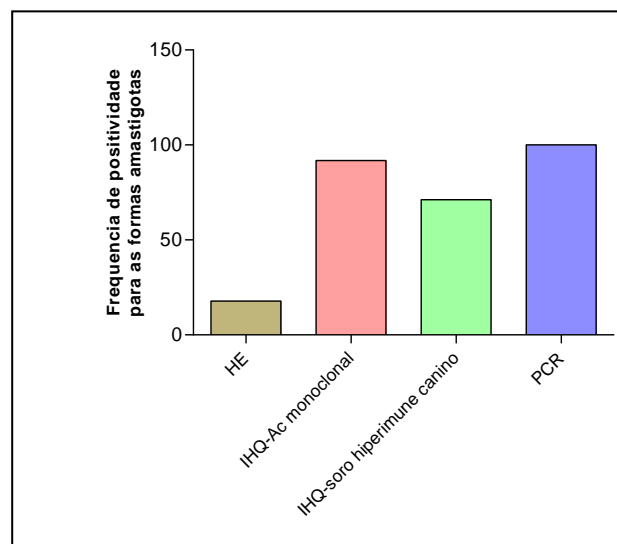


GRÁFICO 12- Frequência de resultados positivos para a presença de *Leishmania* nos fragmentos de pele de 73 pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana, corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) (17,81%), submetidos à técnica de imuno-histoquímica com soro hiperimune canino (91,78%), imuno-histoquímica (IHQ) com anticorpo monoclonal anti-*Leishmania lipophosphoglycan* (LPG) (71,23%) e PCR (100%).

6 DISCUSSÃO

O objetivo principal do presente estudo foi padronizar um método de imuno-histoquímica para o diagnóstico parasitológico de certeza da LTA. Dessa maneira, a necessidade de uma amostra em que todos os pacientes fossem positivos para a doença, através de testes confirmatórios, fez-se necessária.

O município de Caratinga/MG é área endêmica para a LTA e, como se trata de município de colonização antiga, estabelecido em áreas florestais, com o cultivo de café, a manutenção do ciclo de transmissão parece envolver flebotômíneos com hábitos peridomiciliares, tendo roedores e animais domésticos como reservatórios.

A transmissão da infecção tem lugar na interface da área peridomiciliar com as áreas de mata, onde o homem costuma desenvolver atividades agropecuárias, sujeita às flutuações da densidade populacional dos flebotômíneos (GENARO, 1993; BASANO et. al., 2004).

Nos portadores de lesões cutâneas que procuram espontaneamente o ambulatório de leishmanioses de Caratinga/MG, Centro de Referência de Leishmanioses, o diagnóstico da doença é feito através do Teste do Intradermorreação de Montenegro e da pesquisa direta de parasitos em esfregaços obtidos da borda das lesões cutâneas. Estes são corados pelo Giemsa e examinados ao microscópio ótico sob imersão.

Todos os indivíduos com diagnóstico da LTA recebem tratamento e acompanhamento da doença, até um ano após a cura clínica das lesões.

Há aproximadamente 40 anos, o diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com leishmanioses são feito no ambulatório de leishmanioses de Caratinga/MG, com ampla estrutura técnica e pessoal.

O ambulatório conta com a assistência técnico-científica do grupo de pesquisa chefiado pelo Professor Wilson Mayrink, do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. Nesse ambulatório foram e são realizados vários estudo sobre a LTA, fonte de trabalhos sobre a doença. A estrutura montada preenche todos os requisitos necessários para a obtenção de uma amostra adequada para um projeto de pesquisa, como o proposto nesse estudo.

Assim, fragmentos de pele de 73 pacientes com a pesquisa direta do parasito e teste de Intradermorreação de Montenegro, positivos, foram selecionados para este estudo. Os informes clínicos foram obtidos em prontuário médico padronizado e usado no ambulatório de leishmanioses de Caratinga/MG.

Não se estipulou idade, sexo ou tempo de aparecimento da(s) lesão(ões) como critério de inclusão dos pacientes no estudo. Foi considerada apenas a positividade nos testes acima citados e ausência de tratamento prévio das lesões cutâneas. As demais características como idade, sexo, tempo de aparecimento e tamanho das lesões foram aleatórias.

Consoante trabalho realizado por GOMES *et al.* (2008), na maioria dos pacientes (86,30%) as lesões eram recentes, com um a 03 três meses de evolução. Em 13,70% dos pacientes o tempo de surgimento das lesões variou entre três a seis meses. Assim, os pacientes procuraram o ambulatório com intervalo de tempo entre 15 a 180 dias, com uma média de 50 dias do surgimento da lesão inicial.

A procura por atendimento médico, de forma relativamente rápida, reflete o perfil epidemiológico da população local, cujo reconhecimento da doença é bastante razoável. Muitos deles conhecem a suas conseqüências e a limitação da capacidade laborativa, além de aspectos epidemiológicos e terapêuticos (COSTA *et al.*, 1987; SILVA *et al.*, 1999; NOGUEIRA *et al.*, 2001).

A busca pelos pacientes com lesões de pele ainda recentes, para atendimento no ambulatório de leishmanioses de Caratinga/MG, contribuiu para a obtenção facilitada dos pacientes seguramente positivos para LTA para o trabalho proposto. De fato, a observação das formas amastigotas de *Leishmania* é inversamente proporcional ao tempo de surgimento das lesões (FURTADO, 1980; SALINAS *et al.*, 1989; GONTIJO *et al.*; 2003; BRASIL, 2007; GOMES *et al.*, 2008; MOURA, 2009).

Todos os pacientes incluídos nesse estudo apresentaram teste de Intradermorreação de Montenegro (IRM) positivo, com diâmetro de induração variando entre 05mm e 35mm de diâmetro. Diferentes estudos demonstram a elevada sensibilidade do método, sendo importante para suspeitar do diagnóstico em lesões antigas, em que a pesquisa direta do parasito é prejudicada pela difícil visualização histológica das formas amastigotas (PIRMEZ *et al.*, 1999; VENZAZZI *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2008). Entretanto, a IRM não permite distinguir lesões

ativas, inativas, infecções prévias e a permanência da positividade após a cura (PIRMEZ *et al.*, 1999).

Ainda como pré-requisito para alcançar o objetivo do trabalho, foi realizada a técnica de PCR nas 73 biópsias de pele, fixadas em formalina e incluídas em parafina. Como resultado, todos os fragmentos de pele analisados foram positivos para *Leishmania*. De acordo com o descrito na literatura, a PCR é muito útil para o diagnóstico de leishmaniose, bem como outras doenças parasitárias, pois se trata de uma técnica de alta especificidade e sensibilidade (BOTELHO *et al.*, 1998; SINGH *et al.*, 2003; TAVARES *et al.*, 2003). Entretanto, a PCR ainda não tem uma aplicação prática na rotina diagnóstica devido a vários fatores, tais como o alto custo, risco de contaminação das reações, exigindo infra-estrutura adequada e mão de obra capacitada (DE OLIVEIRA *et al.*, 2002).

O perfil sócio-demográfico dos indivíduos deste estudo confirmou o padrão epidemiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana no estado de Minas Gerais e, principalmente, da microrregião de Caratinga/MG.

Observou-se que todos os pacientes apresentaram a forma cutânea da doença, com uma a quatro lesões de pele. Dados da literatura relatam que 95% dos casos de LTA em Minas Gerais, são representados pela forma cutânea e apenas 3% pela a forma mucocutânea (SES, 2010; BASANO *et al.*, 2004; MACHADO-COELHO *et al.*, 1999).

Houve prevalência da LTA em indivíduos do gênero masculino (57,50%) sobre o feminino (42,50%). Este dado está de acordo com outros trabalhos da literatura (GENARO, 1993; SILVEIRA *et al.*, 1996; MACHADO-COELHO *et al.*, 1999; GONTIJO *et al.*, 2002; D'ÁVILA *et al.*, 2004; BRASIL, 2007; MOURA *et al.*, 2009), que demonstram um novo perfil da doença no país, ou seja, um acometimento dos dois sexos, podendo estar associado às atividades ocupacionais e de lazer em áreas consideradas de risco, como o Vale do Rio Doce, em Minas Gerais.

Na amostra estudada, a LTA predominou em indivíduos com a idade entre 16 a 45 anos (68,50%), com média de 33,82 anos, faixa etária laborativa, portanto mais requisitada para o trabalho e, assim sujeita a maior exposição ao vetor. Tais resultados estão em concordância com estudos realizados pela Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais (SES), em 2006.

No presente estudo houve divergência no que concerne ao acometimento da doença por pacientes com até 10 anos de idade. Apenas 4,11% dos pacientes estavam na faixa etária de um a 10 anos. No período de 2001 a 2006, conforme disponibilizado pela SES (2006), cerca de 20% da população com LTA possuía até 10 anos de idade. A ocorrência da LTA em crianças é sempre um motivo de grande preocupação para os serviços de saúde pública, já que essa população apresenta maior possibilidade de converter lesões cutâneas em lesões mucosas, por possuírem maior tempo para fazê-la (AMPUERO *et al.*, 2006). Também é nesta faixa etária, que preponderam lesões cutâneas múltiplas acima da cintura, que teriam um risco 2,8 vezes maior de desenvolverem lesão na mucosa (LLANOS-CUENTAS *et al.*, 1984; AMPUERO *et al.*, 2006). Acresce ainda, a dificuldade de aplicação dos tratamentos específicos, todos de uso parenteral, em crianças muito pequenas (MARSDEN *et al.*, 1985).

A explicação para a sugestiva ocorrência familiar de casos de LTA não tem encontrado suporte em uma predisposição genética e parece mais dependente de fatores epidemiológicos ambientais, sócio-culturais e comportamentais (WONG *et al.*, 1986).

Um dado relevante, observado neste estudo, foi o local de residência dos pacientes. Observou-se que 94,52% deles residiam na zona rural. Tal fato está em concordância com o padrão de transmissão da infecção na região de Caratinga/MG, descrito na literatura (BASANO *et al.*, 2004), onde ainda há focos residuais de mata primária e a transmissão da doença ocorre na interface da área peridomiciliar e nas áreas de mata, onde predominam atividades relacionadas à agricultura.

Dos pacientes estudados, 49,30% eram lavradores, o que demonstra a presença de espécies de vetores da LTA em áreas modificadas, como regiões utilizadas para a agricultura, seguida pela ocupação doméstica. A presença da doença em mulheres e crianças reforça as observações descritas na literatura, de ocorrência da transmissão da LTA no domicílio e peridomicílio (SES, 2010). Há muitas décadas, a *L. braziliensis* tem se expandido dentro de regiões periurbanas e áreas urbanas do país, infectando homens, cães e às vezes muaras (SANTOS *et al.*, 2000; CATALDO *et al.*, 2010) e há autores que consideram a tendência da domicialização dos vetores da LTA (SANTOS *et al.*, 2000).

A localização das lesões foi, em sua maioria, em áreas mais expostas do corpo, como face, e membros, consoante ao descrito na literatura (D'ÁVILA *et al.*, 2004; PAVLI *et al.*, 2010).

Quanto ao número de lesões, 78,08% dos pacientes apresentaram uma única lesão, e em 15,07% duas lesões, concordante com estudos anteriores, que evidenciam que, o percentual de pacientes com até duas lesões de LTA varia entre 64 e 92% (CORTE *et al.*, 1996; VERONESI *et al.*, 2002; D'ÁVILLA *et al.*, 2004). A procura do médico pelo paciente com mais de uma lesão, em áreas expostas, facilita o diagnóstico precoce da LTA.

Não foi objetivo deste trabalho adotar as classificações de padrões histopatológicos propostas por diversos autores em estudos anteriores (RIDLEY *et al.*, 1980; MAGALHÃES *et al.*, 1982; MAGALHÃES *et al.*, 1986a; MAGALHÃES *et al.*, 1986b; BITTENCOURT E BARRAL, 1991), já que, vários tipos de alterações histológicas podem ser vistas em um mesmo paciente e até mesmo, em uma mesma lesão (BITTENCOURT E BARRAL, 1991).

Pode-se observar que as alterações morfológicas que predominaram nos fragmentos de lesões avaliadas nesse estudo foram: moderada a acentuada hiperqueratose, papilomatose e acantose, além de processo inflamatório crônico inespecífico constituído por um infiltrado linfoplasmocitário, ocasionalmente associado à presença de células polimorfonucleares. Esses achados histopatológicos estão de acordo com aqueles descritos por BOTELHO *et al.* (1998), em estudo realizado com pacientes dessa mesma região. A necrose tecidual, observada em 41,1% dos casos aqui descritos, também está de acordo com estudos anteriores realizados por pesquisadores em outras regiões no país (RIDLEY *et al.*, 1980; MAGALHÃES *et al.*, 1986b; MOURA *et al.*, 2009). A formação granulomatosa ocorreu em apenas quatro casos examinados, sem formação de granulomas típicos. Esse resultado é concordante com outros estudos histopatológicos das lesões por LTA na região de Caratinga/MG (BOTELHO *et al.*, 1998).

Dos 73 fragmentos de pele corados pela HE, apenas 13 amostras (17,81%) foram positivas para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania*. Esses dados corroboram com aqueles encontrados em vários outros estudos científicos (FURTADO, 1980; ASHFORD, 2000; GONTIJO *et al.*, 2003; MARFURT *et al.*, 2003; VAN DER MEIDE *et al.*, 2005). De acordo com a literatura, essa baixa positividade parasitológica pode ser explicada pela dificuldade da identificação das

formas amastigotas do parasito associado à presença de exsudado inflamatório, restos celulares, fibrina.

Ao empregar a técnica de imuno-histoquímica padronizada nesse trabalho, com uso do soro hiperimune de cão naturalmente infectados por *L. infantum chagasi*, como anticorpo primário, houve um incremento significativo da sensibilidade para o diagnóstico da LTA. Com a utilização desse método confirmatório para diagnóstico para LTA, encontramos positividade em 67 amostras (91,78%) ao exame sob microscopia ótica, sem uso da objetiva de imersão. Nos fragmentos de pele as formas amastigotas de *Leishmania* mostraram-se bem individualizadas (algumas vezes evidenciando-se o cinetoplasto), de conformação ovalada, preferencialmente localizadas no interior dos macrófagos ou por vezes fora deles, na derme superficial e/ou profunda, de coloração acastanhada, que é característica do método imuno-histoquímico da peroxidase. As amastigotas foram facilmente diferenciadas dos restos celulares, áreas de necrose, inclusões citoplasmáticas. Ressalta-se que os fragmentos de pele submetidos ao método padronizado não apresentaram coloração de fundo inespecífica (“background”), o que, certamente dificulta a pesquisa do parasito.

Na técnica de imuno-histoquímica utilizando como anticorpo, anticorpo monoclonal anti-*Leishmania lipophosphoglycan* observou-se a presença de formas amastigotas em 71,23% dos fragmentos de pele da amostra. Entretanto, esse método dependeu de maior tempo para a identificação do parasito pela microscopia ótica, em decorrência da constante presença de coloração de fundo (“background”). Observou-se, nos fragmentos de pele com LTA submetidos a essa técnica, uma intensa coloração marrom do citoplasma das células do exsudado inflamatório, principalmente de macrófagos, bem como das células epiteliais.

O método de imuno-histoquímica padronizado apresentou elevada sensibilidade para a confirmação do diagnóstico da LTA, maior facilidade de execução e menor custo (considerando uma maior facilidade de obtenção do soro cão infectado por *L. infantum chagasi* como anticorpo primário) quando comparada às técnicas de PCR e de imuno-histoquímica empregando anticorpo monoclonal comercial.

A técnica de imuno-histoquímica realizada nos fragmentos de pele da amostra, que utilizou como anticorpo primário, soro hiperimune de cão naturalmente infectados por *L. infantum chagasi*, e como sistema de identificação da

ligação do anticorpo com antígenos de *Leishmania*, um polímero livre de biotina (DAKO Advance HRP® – K 4068), em comparação com a técnica de imunohistoquímica padronizada, que usou o complexo da estreptoavidina peroxidase, apresentou: a mesma sensibilidade, também permitiu a observação das amastigotas de *Leishmania* de forma fácil, sem coloração de fundo inespecífica e ainda apresentou notável redução do tempo de execução (de 24 horas para 06 horas).

Com o emprego de soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *L. infantum chagasi*, como anticorpo primário e um polímero livre de biotina, obteve-se um método de imunohistoquímica de alta sensibilidade, de fácil e rápida execução.

Atualmente os polímeros são bem empregados na realização de métodos de imunohistoquímica para identificação de cânceres e receptores hormonais (RAMOS-VARA *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2009), porém, não há descrito na literatura, os benefícios do emprego desses polímeros no diagnóstico de doenças infecto-parasitárias. Dessa forma, esse trabalho permitiu constatar que o uso de polímero livre de biotina no diagnóstico imunohistoquímico da LTA, apresentou grande aplicabilidade, pela alta sensibilidade, rapidez, associado ao fato de o custo ser equivalente ao do sistema de visualização da estreptoavidina-biotina.

As espécies de *Leishmania* apresentam grande homologia genética que varia entre 69% a 90% (HANDMAN, 2001). Em decorrência dessa homologia, algumas proteínas são compartilhadas entre espécies de *Leishmania* de diferentes complexos, classificadas como antígenos de reação cruzada (GARDINER *et al.*, 1984). Essa homologia tem sido demonstrada em estudos sobre vacinas, sendo utilizadas diferentes espécies de *Leishmania* e se obtendo respostas com reações cruzadas (MAYRINK *et al.*, 1979; PEREZ, *et al.*, 1979; RAMASAMY *et al.*, 1983; RACHAMIM *et al.*, 1993; LARSRI *et al.*, 1999).

Em trabalho realizado por VALE *et al.* (2009) com soro de cão naturalmente infectado por *L. infantum chagasi*, um grande número de proteínas (antígenos solúveis) de espécies de *Leishmania* que causam LTA foram reconhecidas por anticorpos (IgG) presentes no soro desses animais. O maior reconhecimento pelos anticorpos presentes no soro dos cães do estudo foi o de proteínas presentes em *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, seguida por *L. braziliensis*. A diferença de reconhecimento entre soros de cães assintomáticos e sintomáticos foi pequena, apesar de existente, o que demonstrou alterações no repertório de clones

de plasmócitos que são mobilizados durante a progressão da infecção por *L. infantum chagasi* nos cães.

No presente trabalho, o reconhecimento de antígenos de parasitos da espécie *Leishmania*, causadoras de LTA, por soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *L. infantum chagasi*, reflete a ocorrência de reações cruzadas entre proteínas compartilhadas entre espécies de *Leishmania* pertencentes a diferentes complexos. A reação cruzada foi aplicada na padronização de uma técnica de imuno-histoquímica de fácil execução, de menor custo e alta reprodutibilidade para o diagnóstico de LTA.

Assim, consoante ao estudo realizado por TAFURI *et al.*, (2004) que padronizou uma técnica de imuno-histoquímica alternativa para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, e a realiza, rotineiramente, através de um projeto de extensão com a FUNDEP (Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa – Projeto 5830-Sub28), almeja-se, a partir desse trabalho e outros futuros, disponibilizar a técnica de imuno-histoquímica padronizada nesse estudo, para o diagnóstico da LTA, de forma rápida e com maior acesso à população portadora da doença, antes da instituição do tratamento.

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto, concluiu-se que o método imuno-histoquímico proposto, que empregou como anticorpo primário, soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum chagasi*:

- ✓ Apresentou-se tão específico quanto aqueles métodos que utilizam anticorpos monoclonais comerciais ou policlonais e com a identificação das formas amastigotas de forma mais fácil, pela baixa ocorrência de coloração de fundo (“background”);
- ✓ Permitiu a identificação do parasito de maneira consideravelmente mais fácil, quando comparada à pesquisa de amastigotas em fragmentos de pele submetidos à coloração pela HE, sem a necessidade do uso da objetiva de imersão;
- ✓ Mostrou-se altamente específico, sensível, de baixo custo e com alta reprodutibilidade para a detecção de forma amastigotas de *Leishmania* sp. em fragmentos de bordas de lesões, fixados em formalina tamponada e incluídos em parafina, quando comparado com outras técnicas diagnósticas de certeza da leishmaniose tegumentar americana, como imuno-histoquímica e a PCR;
- ✓ Apresentou-se aplicável em centros de saúde, por demandar de estrutura laboratorial simples e ser de fácil execução, dentro da realidade político social do Brasil;
- ✓ Foi superior a outros métodos atualmente empregados e disponíveis para o diagnóstico da LTA como o teste de intradermorreação de Montenegro e pesquisa direta do parasito em esfregaços por aposição de fragmentos de pele corados pelo Giemsa;
- ✓ A utilização de um polímero livre de biotina ao invés da estreptoavidina peroxidase, como sistema de reconhecimento indireto da ligação anticorpo primário com antígenos de *Leishmania* em fragmento de pele, proporcionou notável redução no tempo de execução do método de imuno-histoquímica (de 24 horas para 06 horas).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMPUERO, J.; MACÊDO, V.; MARSDEN, P. Características clínicas da leishmaniose tegumentar em crianças de 0 a 5 anos em uma área endêmica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.39, n.1, p.22-26, 2006.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, v.30, p.1269-1281, 2000.

AZULAY, R.D. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar. *Dermatol Iber Latin Am*, v.2, p.7-15, 1960.

BADARÓ, R.; REED, S.G.; BARRAL, A.; ORGE, G.; JONES, T.C. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies on american visceral *Leishmaniasis*: antigen selection for detection of infection-specific responses. *Am J Trop Med Hyg*, v.35, n.1, p.72-78, 1986.

BAILEY, M.S.; LOCKWOOD, D.N.J. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*, v.25, n.2, p.203-211, 2007.

BARBOSA, A.J.A. As Técnicas de Imunoperoxidase no Estudo da Etiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.21, p.1-6, 1988.

BARRAL, A.; ALMEIDA, R.P.; DE JESUS, A.R., MEDEIROS-NETO, E.; SANTOS, I.A.; JOHNSON, J.R.W. The relevance of characterizing *Leishmania* from cutaneous lesion. A simple approach for isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.82, p.579-581, 1987.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Bras Epidemiol*, v.7, p.328-337, 2004.

BITTENCOURT, A.L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.86, n.1, p.51-56, 1991.

BOTELHO, A.C.C.; TAFURI, W.L.; GENARO, O.; MAYRINK, W. Histopathology of human american cutaneous leishmaniasis before and after treatment. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.31, p.11-18, 1998.

BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J.P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J Vet Diagn Invest*, v.9, p.439, 1997.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana, 2ªed., Brasília, 2007, 182p.

BRAY, R. *Leishmaniasis*. In: Immunological Investigations of Tropical Parasitic Diseases, (Houba, V, ed) Churchill Livingstone. Edinburg, 1976, p.65-83.

CABRERA, G.P.; DA SILVA, V.O.; DA COSTA, R.T.; REIS, A.B.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral Leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, v.61, n.2, p.296-301, 1999.

CAMARGO, L.M.A.; BARCINSKI, M.A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Ciência e Cultura*, v.1, p.34-37, 2003.

CAMARGO, M.E.; REBONATO, C. Cross reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. *Am J Trop Med Hyg*, v.18, p.500-505, 1969.

CARDOSO, L.; CABRAL, M. *Leishmania* and canine Leishmaniasis. *Rev Port Ciênc Vet*, v.93, n.527, p.122-141, 1998.

CARVALHO, M.L.R. *Aspectos da imunidade celular em pacientes com leishmaniose tegumentar americana, procedentes de área endêmica do Estado de Mato Grosso-Brasil, antes e após o tratamento com antimonial pentavalente*. 2000. 157f. Tese (Doutorado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

CARVALHO, E.M.; CORREA-FILHO, D.; BARCELAR, O.; ALMEIDA, R.P.; LESS, H.; ROCHA, H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v.53, p.273-277, 1995.

CATALDO, J.I.; MELLO, F.C.Q.; MOUTA-CONFORT, E.; MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O.; GENESTRA, M.S.; RIBEIRO, F.C.; MOREIRA-VENÂNCIO, C.F.; PASSOS, S.R.L. Immunoenzymatic assay for the diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis using soluble and membrane-enriched fractions from infectious *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Clin Lab Anal*, v.24, p.289-294, 2010.

CHIARI, C.A.; MAGALHÃES, P.A.; MAYRINK, W. Pesquisa de anticorpos, por imunofluorescência, em soros de pacientes com leishmaniose tegumentar americana apresentando lesões cutâneas recentes. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.15, p.304-309, 1973.

CORTE, A.A.; NOZAWA, M.R.; FERREIRA, M.C.; PIGNATTI, M.G.; RANGEL, O.; LACERRA, S.S. Aspectos eco-epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana no Município de Campinas. *Cad Saúde Pública*, v.12, n.4, p.465-472, 1996.

COSTA, J.M.L.; VALE, K.C.; CECÍLIO, I.N.; OSAKI, N.K.; NETTO, E.M.; TADA, M.S.; FRANÇA, F.; BARRETO, M.C.; MARSDEN, P.D. Aspectos psicossociais e estigmatizantes da leishmaniose cutâneo-mucosa. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.20, p.77-82, 1987.

COUTINHO, S.G.; NUNES, M.P.; MARZOCHI, M.C.; TRAMONTANO, N. A survey for american cutaneous and visceral Leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil), where the disease occur. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.80, n.1, p.17-22, 1985.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*, v.19, p.111-126, 2006.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol*, v.72, n.2, p.132-41, 2002.

D'ÁVILA, S.C.G.P.; SILVA, J.; MEDOLA, B.O.; SHIBUKAWA, R.H. Estudo retrospectivo dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana diagnosticados no laboratório de patologia do Hospital de Base da FAMERP nos anos de 1995-2000, com enfoque clínico e anatomopatológico. *Arquivos Ciência e Saúde*, v.11, n.2, p.2-5, 2004.

DA COSTA, C.A.; GENARO, O.; DE LANA, M.; MAGALHÃES, P.A.; DIAS, M.; MICHALICK, M.S.; MELO, M.N.; DA COSTA, R.T.; MAGALHÃES-ROCHA, N.M.; MAYRINK, W. Canine Visceral Leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.24, n.1, p.21-25, 1991.

DE BRUIJN, M.H.L.; BARKER, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: Specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica*, v.52, p.45-58, 1992.

DE OLIVEIRA, C.I.; BÁFICA, A.; OLIVEIRA, F.; FAVALI, C.B.F.; CORREA, T.; FREITAS, L.A.R.; NASCIMENTO, E.; COSTA, J.M.; BARRAL, A. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, v.37, p.149-153, 2003.

DEDET, J.P.; PRATLONG, F. *Leishmania*, *Trypanosoma* and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. *J Eukaryot Microbiol*, v.47, p.37-39, 2000.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v.27, n.5, p.305-18, 2004.

DUJARDIN, J.C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol*, v.22, n.1, p.4-6, 2006.

ESCOBAR, M.A.; MARTINEZ, F.; SCOTT, S.D.; PALMA, G.I. American Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (tegumentary): a diagnostic challenge. *Trop Doct*, v.22, p.269-278. 1992.

FERRER, L.; RABANAL, R.M.; DOMINGO, M.; RAMOS, J.A.; FONDEVILA, D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res Vet Sci*, v.4, p.194-6. 1988.

FURTADO, T. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: *Machado-Pinto J (ed), Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas*. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, 1994a, p.319-328.

FURTADO, T. Critérios para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.65, p.51-86, 1994b.

FURTADO, T. Critérios para diagnóstico de LTA. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.65, p.51-86, 1980.

GARDINER, P.R.; JAFFE, C.L.; DWYERAND, D.M. Identification of cross-reactive promastigote cell surface antigens of some leishmanial stocks by ¹²⁵I labeling and immunoprecipitation. *Infect Immun*, v.43, n.2, p.637-643, 1984.

GENARO, O. Prevalence of human intestinal parasites in the town of Alpercata, Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.24, n.3, p.181-182, 1991.

GENARO, O. *Leishmaniose visceral canina experimental*. 1993. 202f. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GIL, L.H.S. Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisii* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.98, n.6, p.751-755, 2003.

GOMES, A.H.; ARMELIN, I.M.; MENON, S.Z.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. *Leishmania (V.) braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*, v.119, p.319-242, 2008.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.36, n.1, p.71-80, 2003.

GONTIJO, C.M.F.; SILVA, E.S.; FUCCIO, M.D.; SOUSA, M.C.A.; PACHECO, R.S.; DIAS, J.D.; ANDRADE-FILHO, J.D.; BRAZIL, R.P.; MELO, M.N. Epidemiological studies of outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Tropica*, v.81, p.143-150, 2002.

GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; MANCIANTI, F.; PIERI, S. Studies on Canine Leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against Canine Visceral Leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.82, n.4, p.568-571, 1988.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol*, v.35, p.1169-1180, 2005.

GRIMALDI, J.R.G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*, v.6, p.230-250, 1993.

GUERRA, J.A.; RIBEIRO, J.A.; COELHO, L.I.; BARBOSA, M.G.; PAES, M.G. Epidemiology of tegumentary leishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil. *Cad Saúde Pública*, v.22, n.11, p.2319-2327, 2006.

GUTIERREZ, Y.; SALINAS, G.H.; PALMA, G.; VALDERRAMA, L.B.; SANTRICH, C.V.; SARAIVA, N.G. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am J Trop Med Hyg*, v.45, n.3, p.281-289, 1991.

- HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. *Clin Microbiol Rev*, v.14, p.229-243, 2001.
- HOMMEL, M. Enzymoimmunoassay in Leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.70, p.15-16, 1976.
- KAGAN, I. Advances in the immunodiagnosis of parasitic infections. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, v.45, p.163-195, 1974.
- KAR, K. Serodiagnosis of Leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol*, v.21, n.2, p.123-152, 1995.
- KENNER, J.R.; ARONSON, N.E.; BRATTHAUER, G.L.; TURNICKY, R.P.; JACKSON, J.E.; TANG, D.B.; SAU, P. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. *J Cutan Pathol*, v.26, n.3, p.130-136, 1999.
- KILLICK-KENDRICK, R.; RIOUX, J.A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in the sandflies. *Ann Parasit Hum Comp*, v.66, n.1, p.71-74, 1991.
- KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp*, v.65, n.1, p.37-42, 1990.
- LACERDA, M.M. The Brazilian leishmaniasis control program. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.89, p.489-495, 1994.
- LAINSON, R. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina*, v.11, n.1, p.29-40, 1997.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SOUZA, A.A.; SILVEIRA, F.T.; FALQUETO, A. Further observations on *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae), the sandfly vector of *Leishmania (Viannia) lainsoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.87, p. 437-439, 1992.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. A brief history of genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, v.44, p.94-106, 1992.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. New world Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In: Topley & Wilson. *Microbiology and Microbial Infections*, (9 a ed). London: Ed. Feg Cox; 1988.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters Killick-Kendrick, ed. - The Leishmaniasis in biology and Medicine. *London Academic Press*, v.1, p.1-128, 1987.
- LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.77, p.569-596, 1983.
- LARSRI, S.; SAHIBI, H.; NATAMI, A.; RHALEM, A. Western blot analysis of *Leishmania infantum* antigens using sera from pentamidine-treated dogs. *Vet Immunol Immunop*, v.91, n.1, p.13-18, 2003.

- LIVNI, N.; ABRANOWITZ, A.; LONDNER, M.; OKON, E.; MORAG, A. Immunoperoxidase method of identification of *Leishmania* in routinely prepared histological sections. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, v.401, n.2, p.147-51, 1983.
- LLANOS-CUENTAS, E.A.; MARSDEN, P.D.; CUBACUBA, C.; BARRETO, A.C.; CAMPOS, M. Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. *Lancet*, v.2, p.295, 1984.
- LYNCH, N.R.; MALAVÉ, C.; IFANTE, R.B.; MODLIN, R.L.; CONVIT, J. *In situ* detection of amastigotes in American cutaneous leishmaniasis, using monoclonal antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.80, p.6-9, 1986.
- MACHADO-COELHO, G.L.; ASSUNÇÃO, R.; MAYRINK, W.; CAIAFFA, W.T. American cutaneous leishmaniasis in Southeast Brazil: space-time clustering. *Int J Epidemiol*, v.28, n.5, p.982-9, 1999.
- MAGALHÃES, A.V.; MORAES, M.A.P.; RAICK, A.N.; LLANOS-CUENTAS, A.; COSTA, J.M.L.; CUBA, C.C.; MARSDEN, P.D. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1 - Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. *Rev Inst Med Trop*, v.28, n.4, p.253-262, 1986a.
- MAGALHÃES, A.V.; MORAES, M.A.P.; RAICK, A.N.; LLANOS-CUENTAS, A.; COSTA, J.M.L.; CUBA, C.C.; MARSDEN, A. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 4. classificação histopatológica. *Rev Inst Med Trop*, v.28, n.6, p.421-430, 1986b.
- MAGALHÃES, A.V.; LLANOS-CUENTAS, A.; CUBA C.; *et al.* Nova classificação histopatológica da Leishmaniose Tegumentar. Anais do VI Congresso da Regional Centro-Leste da S. B. de Patologistas, 03 a 06 Nov. Uberlândia – MG, 1982.
- MANSON-BAHR, P.E. Diagnosis. In: *The Leishmaniasis*. London, Peters W. & Kilich-Kendrick R, v.2, p.703-728, 1987.
- MARFURT, J.; NASEREDDIN, A.; NIEDERWIESER, I.; JAFFE, C.L.; BECK, H.P.; FELGER, I. Identification and Differentiation of *Leishmania* Species in Clinical Samples by PCR Amplification of the Miniexon Sequence and Subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol*, v.41, n.7, p.3147-3153, 2003.
- MARSDEN, P.D.; ALMEIDA, E.A.; LLANOS-CUENTAS, E.A.; COSTA, J.M.L.; MAGALHÃES, A. V.; PETERSON, N.; CUBA-CUBA, C.; BARRETO, A. C. *Leishmania braziliensis braziliensis* infection of the nipple. *B M J*, v.290, p.433-434, 1985.
- MARSDEN, P.D.; NETTO, E.M.; BADARÓ, R.; CUBA, C.A.; COSTA, J.L.; BARRETO, A.C. Apparent cure of a difficult treatment problem in a patient with mucosal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v.35, n.2, p.449, 1986.
- MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil – Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. *Cad Saúde Pública*, v.10, n.2, p.359-375, 1994.

MARZOCHI, M.C.A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *J B M*, v.63, p.82-104, 1992.

MAYRINK, W. *et al.* Multinational development of standart skin test antigen in American: preliminary results in the Minas Gerais state, Brazil. 2^a. Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambu – MG. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 8, p.226, 1993a.

MAYRINK, W. Relatório de atividades no ambulatório de leishmanioses de Caratinga, Minas Gerais, no Período de 1989-1992. Setor de Leishmanioses- Departamento de Parasitologia-ICB/UFMG, 1993b.

MAYRINK, W.; DA COSTA, P.A.; MAGALHÃES, P.A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; LIMA, A.O.; MICHALICK, M.S.; WILLIAMS, P. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.73, n.4, p.385-387, 1979.

MEHREGAN, D.R.; MEHREGAN, A.H.; MEHREGAN, D.A. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*, v.17, n.3, p.297-304, 1999.

MELO, M.N. *Cultivo de Leishmania em meio definido. Estudo de seus requerimentos nutricionais*. 1982. 133f. Tese (Doutorado em Parasitologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 1982.

MELO, M.N.; MAYRINK, W.; COSTA, C.A.; MAGALHÃES, P.A.; WILLIAMS, P.; ARAÚJO, F.G.; COELHO, M.V.; BATISTA, S.M. Padronização do antígeno de Montenegro. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.19, p.161-164, 1977.

MOLINA, R.; GRADONI, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol*, v.97, p.29-45, 2003.

MONTENEGRO, J. Cutaneous reactions in leishmaniasis. *Arc Dermatol Syph*, v.13, p.187, 1926.

MORAES, M.A.P.; SILVEIRA, F.T. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Inst Med Trop*, v.36, n.5, p.459-463, 1994.

MOURA, A.P.V. *Avaliação histomorfológica das lesões de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) atendidos no município de Montes Claros – Minas Gerais*. 2009. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, MG, 2009.

NASCIMENTO, L.D.; PASSOS, S.R.; MOUTA-CONFORT, E.; SANTIAGO, M.A.; ALVES, A.S.; MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O.; MARZOCHI, M.C. Comparative study of amplification systems in immunoenzyme assays for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *J Clin Lab Anal*, v.23, n.3, p.152-156, 2009.

NICOLIS, G.D.; TOSCA, A.D.; STRATIGOS, J.D.; CAPETANAKIS, J.A. A clinical and histological of cutaneous leishmaniasis. *Acta Dermatovener*, v.58, p.521-525, 1978.

NOGUEIRA, L.S.C.; SAMPAIO, R.N.R. Estudo hospitalar de leishmaniose tegumentar americana (LTA): epidemiologia e tratamento. *An Bras Dermatol*, v.76, n.1, p.51-62, 2001.

OUMEISH, O.Y. Cutaneous Leishmaniasis: a historical perspective. *Clin Dermatol*, v.17, n.3, p.249-254, 1999.

PASSOS, V.M.; BARRETO, S.M.; ROMANHA, A.J.; KRETTLI, A.U.; VOLPINI, A.C.; LIMA, E.; COSTA, M.F. American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. *Bull World Health Organ*, v.78, n.8, p.968-974, 2000.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H.C. Leishmaniasis: an emerging infection in travelers. *Int J of Infect Dis*, v.14, p.1032-1039, 2010.

PEREIRA, C.G.; SILVA, A.L.N.; REZENDE, R.J.; SOUZA, R.A.; DE CASTILHOS, P.; MASTRANTÔNIO, E.C.; BELETTI, M.E.; DE SOUZA, M.A. Imunohistoquímica revela formas amastigotas de *Leishmania* do complexo *braziliensis* em modelo murino. In: VIII Encontro Interno. XII Seminário de Iniciação Científica, 2008, Uberlândia, MG. Universidade Federal de Uberlândia, 2008, p.1-13.

PÉREZ, H.; ARREDONDO, B.; MACHADO, R. *Leishmania mexicana* and *Leishmania tropica*: Cross immunity in C57BL/6 mice. *Exp Parasitol*, v.48, n.1, p.9-14, 1979.

PIRMEZ, C.; DA SILVA TRAJANO, V.; PAES-OLIVEIRA NETO, M.; DA-CRUZ, A.M.; GONÇALVES-DA-COSTA, S.C.; CATANHO, M.; DEGRAVE, W.; FERNANDES, O. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*, v.37, n.6, p.1819-23, 1999.

POZIO, E. GRADONI, L.; BETTINI, S.; GRAMICCIA, M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI Canine Leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Tropica*, v.38, p.383-393, 1981.

QUINTELLA, L.P.; CUZZI, T.; MADEIRA, M.F.; OKAMOTO, T.; SCHUBACH, A.O. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.51, n.2, p.83-86, 2009.

RACHAMIM, N.; JAFFE, C.L. Pure protein from *Leishmania donovani* protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis. *J Immunol*, v.150, n.6, p.2322-2331, 1993.

RAMASAMY, R.; KAR, S.K.; JAMNADAS, H. Cross-reacting surface antigens on *Leishmania* promastigotes. *Int J Parasitol*, v.13, n.4, p.337-341, 1983.

RAMOS-E-SILVA, M.; DE MOURA, C.J.C. Leishmaniasis and other dermatozoonoses in Brazil. *Clin Dermatol*, v.20, n.2, p.122-34, 2002.

Ramos-Vara, J.A.; Kiupel, M.; Baszler, T.; Bliven, et al. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest*, v.20, p.393-413, 2008.

- RASO, P.; GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: *Brasileiro Filho, G et al. Bogliolo Patologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- REED, S.G.; SHREFFLER, W.G.; BURNS, J.M.; SCOTT, J.M.; ORGE, M.G.; GHALIB, H.W.; SIDDIG, M.; BADARO, R. An improved serodiagnostic procedure for visceral Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v.43, n.6, p.632, 1990.
- RIDLEY, D.S. Histopathogenic Mechanisms in Leishmaniasis. *Pathologica*, v.75, p.471-79, 1983.
- RIDLEY, D.S; MARSDEN, P.D.; CUBA, C.C.; BARRETO, A.C. A Histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.74, p.508-514, 1980.
- RIOUX, J.A.; LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PERIERES, J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*, v.65, n.3, p.111-125, 1990.
- ROCHA, R.M.; MILLER, K.; SOARES, F.; VASSALLO, J.; SCHENKA, N.; GOBBI, H. The use of the immunohistochemical biotin-free visualization systems for estrogen receptor evaluation of breast câncer. *Applied Cancer Research*, v.29, n.3, p.112-117, 2009.
- ROSS, R. (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and (2) further notes no Leishman's bodies. *Brit Med J*, v.2, p.1261-1401, 1903.
- SALINAS, G.; VALDERRAMA, L.; PALMA, G.; MONTES, G.; SARAVIA, N.G. - Detección de amastigotas en leishmaniasis cutanea y mucocutanea por el metodo de inmunoperoxidasa, usando anticuerpo policlonal: sensibilidad y especificidad comparadas con metodos convencionales de diagnostico. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.84, p.53-60, 1989.
- SALMAN, S.; RUBEIZ, N.G.; KIBBI, A.G. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. *Clin Dermatol*, v.17, p.291-296, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIATIS, T. Gel Eletrophoresis: Polyacrylamide Gel Eletrophoresis. In: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cap.5, p. 173-180, 1982.
- SANTOS, J.B.; LAUAND, B.; DE SOUZA, L.G.S.; MACÊDO, V.O. Fatores sócio-econômicos e atitudes em relação à prevenção domiciliar da leishmaniose tegumentar americana, em uma área endêmica do sul da Bahia, Brasil. *Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro*, v.16, n.3, p.701-708, 2000.
- SANTOS, R.V.; COIMBRA, JR.C.E.A. Saúde e Povos Indígenas. Rio de Janeiro, Ed. FIOCRUZ; 1994.
- SCHECHTER, M.; MARANGONI, D.V. Doenças infecciosas: conduta, diagnóstico e terapêutica. In: *Fernandes NC, editores. Leishmaniose tegumentar americana*. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p.227- 251.

SCHUBACH, A.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A.V, et al. Leishmanial Antigens in the Diagnosis of Active Lesions and Ancient Scars of American Tegumentary Leishmaniasis Patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.96, n.7, 987-996, 2001.

SES – Secretaria do Estado da Saúde de Minas Gerais. Análise da situação de saúde de Minas Gerais, 328f, 2010.

SES – Secretaria do Estado da Saúde de Minas Gerais. Análise da situação de saúde de Minas Gerais, 131f, 2006.

SELLS, P.G.; BURTON, M. Identification of *Leishmania* amastigotes and their antigens in formalin fixed tissue by immunoperoxidase staining. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.75, p.461-468, 1981.

SHAW, J.J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. In: FARREL J., ed., *World Class Parasites: Leishmania*, v.4, *Kluwer Academic Publishers*. Boston, Dordrecht, London, 2003.

SHAW, J.J. The relationship of sand fly ecology to the transmission of leishmaniasis in South America with particular reference to Brasil. In: *Memoirs on Entomology, International*. JFB.(eds). Associated Publishers, 1999.

SHAW, J.J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.69, p.323-335, 1975.

SILVA, N.S.; VIANA, A.B.; CORDEIRO, J.A.; CAVASINI, C.E. Leishmaniose tegumentar americana no Estado do Acre, Brasil. *Rev Saúde Pública*, v.33, n.6, p.554-559, 1999.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Especial Reference to the Disease in Amazonian Brazil – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.99, n.3, p.239-251, 2004.

SILVEIRA, F.T.; MORAES, M.A.P.; SHAW, J.J.; LAINSON, R. Pathology and pathogenesis of cutaneous leishmaniasis of man in the Amazon Region of Brazil caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Acta Parasitol Turcica*, v.21, p.97-98, 1997.

SILVEIRA, T.G.V. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em área endêmica do Estado do Paraná, Brasil. *Cad Saúde Pública*, v.12, n.2, p.141-147, 1996.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent Advances in the Diagnosis of Leishmaniasis. *J Postgrad Med*, v.49, n.1, p.55-60, 2003.

SOUZA, W.J.; SABROZA, P.C.; SANTOS, C.S.; DE SOUSA, E.; HENRIQUE, M.F.; COUTINHO, S.G. Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis

carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. *Acta Trop*, v.52, p.111-119, 1992.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.; GONÇALVES, R.; DE MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods*, v.292, n.1-2, p.17-23, 2004.

TAVARES, C.A.P.; FERNADES, A.P.; MELO, M.N. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn*, v.3, p.657-665, 2003.

TEIXEIRA, A.R.L.; VEXANAT, A.C. O real significado de exames sorológicos no diagnóstico de doenças endêmicas. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.29, n.4, p.379-382, 1996.

VALE, A.M.; FUJIWARA, R.T.; DA SILVA NETO, A.F.; MIRET, J.A.; ALVAREZ, D.C.; DA SILVA, J.C.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO E. Identification of highly specific and cross-reactive antigens of *Leishmania* species by antibodies from *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs. *Zoonoses Public Health*, v.56, n.1, p.41-48, 2009.

VAN DER MEIDE, W.F.; SCHOONE, G.J.; FABER, W.R.; ZEEGELAAR, J.E.; DE VRIES H.J.; OZBEL, Y.; LAI A FAT, R.F.; COELHO, L.I.; KASSI, M.; SCHALLIG, H.D. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. *J Clin Microbiol*, v.43, n.11, p.5560-5566, 2005.

VENAZZI, E.A.; ROBERTO, A.C.; BARBOSA-TESSMANN, I.P.; ZANZARINI, P.D.; LONARDONI, M.V.; SILVEIRA, T.G. Polymerase chain reaction with lesion scrapping for the diagnosis of human American tegumentary Leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.101, n.4, p.427-430, 2006.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de infectologia. In: FALQUETO, A.; SESSA, P.A, editores. *Leishmania* tegumentar americana. 2a ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p.1241-1253.

WALTERS, L.L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sandfly host. *J Eukaryot Microbiol*, v.40, p.196-206, 1993.

WEIGLE, K.A.; DE DÁVALOS, M.; HEREDIA, P. ET AL. - Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous *Leishmaniasis* in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg*, v.36, p.489-496, 1987.

WONG, L.; NETTO, E.M.; WIESE, K.; FRANÇA, F.; CUBA-CUBA, C.; LLANOS-CUENTAS, E.A.; JONES, T.C.; JOHNSON, W.D.; BARRETO, A.C.; MARSDEN, P.D. Unusual prevalence of *Leishmania braziliensis braziliensis* in four families. *Rev da Soc Bras Med Trop*, v.19, p.195-196, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em: <http://www.who.int/Leishmaniasis/en_>. Acesso 25 de agosto de 2011.

Anexo 1



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 0227.0.203.000-11

**Interessado(a): Prof. Wagner Luiz Tafuri
Departamento de Patologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 08 de agosto de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Padronização de um método imunistoquímico alternativo para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em humanos"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

Anexo 2



SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE DE MINAS GERAIS
AMBULATÓRIO PAULO ARAÚJO MAGALHÃES
LABORATÓRIO ESTADUAL DE REFERÊNCIA EM LEISHMANIOSES DE
CARATINGA

FICHA INDIVIDUAL DO PACIENTE COM LEISHMANIOSE

Data: ____/____/____

Nome: _____ Matrícula Nº: _____

Nome da Mãe: _____

Idade: _____ Cor: _____ Sexo: _____ Peso: _____

Altura: _____ Profissão: _____

Endereço Residencial: _____

Local Presumível: _____

Tempo de Evolução: _____ Já teve lesão anterior? _____

Número da Lesão: _____ Tamanho: _____

Localização da(s) Lesão(ões): _____

Teste de Montenegro: _____ Parasitológico Direto: _____

Esquema terapêutico: _____

Início do Tratamento: _____ Término do Tratamento: _____

EXAME CLÍNICO:

Data do exame:

Médico: (Assinatura e Carimbo)

Anexo 3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Patologia Geral

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa chamada “PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO IMUNOISTOQUÍMICO ALTERNATIVO PARA O DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM HUMANOS”. **LEIA COM ATENÇÃO ESTE DOCUMENTO, TENHA CERTEZA DE QUE ENTENDEU E ESCLARECEU SUAS DÚVIDAS ANTES DE RESPONDER AO CONVITE.**

Justificativa e objetivo da pesquisa: A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença de pele, causada por um parasito que pode se apresentar com uma ou com várias lesões de pele e que tem grande importância para a saúde pública.

No Brasil, a LTA acontece em um grande número de pessoas, em todos os estados do país, e é uma doença de pele que merece grande atenção, principalmente pelas dificuldades de diagnóstico (como descobrir a doença), tratamento e por poder causar deformidades.

O projeto de pesquisa que você está sendo convidado a participar quer melhorar o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana, através de uma técnica de laboratório, chamada de imuno-histoquímica, que permite fazer o diagnóstico da doença por conseguir ver o seu agente causador (parasito) nas lesões de pele, de uma forma mais fácil, com menor preço, quando comparados com as técnicas que temos atualmente para o diagnóstico dessa doença.

Com o desenvolvimento de uma técnica alternativa para o diagnóstico

Assinatura/rubrica do paciente participante

Assinatura/rubrica do pesquisador

da LTA, estaremos também ajudando a melhorar tratamento e a cura dos pacientes que têm a leishmaniose tegumentar, pois, na maior parte do país, a doença não é descoberta no seu início, sendo frequente o agravamento das lesões.

Procedimento: Se você aceitar o convite, o fragmento (“pedaço”) de pele, que normalmente é retirado da borda de sua lesão, para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar no ambulatório de leishmanioses “Paulo Araújo Magalhães”, de Caratinga/MG, será aproveitado para o desenvolvimento da pesquisa. Esse fragmento de pele será guardado de forma adequada e levado para o Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em Belo Horizonte.

Para uma pesquisa adequada, será de grande importância que você permita que possamos ver informações importantes sobre suas lesões (o número de lesões apresentadas, a época de surgimento das lesões e se já fez ou não algum tipo de tratamento para tentar curar a lesão), sobre os resultados dos exames que você fez no ambulatório de leishmanioses de Caratinga, e que estão arquivados no próprio ambulatório de Caratinga.

Desconfortos, riscos e benefícios: Por fazer parte de uma pesquisa que procura melhorar o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana, o fragmento de pele da borda de sua lesão, que normalmente seria jogado fora, após a realização do diagnóstico da doença, no ambulatório de leishmanioses de Caratinga/MG, será aproveitado para a pesquisa, sem qualquer dano (dor física, medo, insegurança) para você. Ao concordar em fazer parte da pesquisa, não terá nenhum gasto financeiro, e nem receberá dinheiro para participar. Provavelmente, você, como os outros participantes, não terão benefícios diretos com o desenvolvimento da pesquisa. Porém sua participação será de grande e fundamental importância, pois, os pesquisadores, após analisarem o material de todos os pacientes participantes, poderão conseguir aprimorar uma técnica de diagnóstico para a LTA, o que poderá ajudar muitos outros pacientes com a mesma doença no futuro.

Assinatura/rubrica do paciente participante

Assinatura/rubrica do pesquisador

Acompanhamento, e assistência e esclarecimentos: Se você aceitar ou não o convite, contará com os serviços do Ambulatório de Leishmanioses “Paulo Araújo Magalhães” da mesma maneira, como se a pesquisa não existisse.

Seus exames para o diagnóstico da LTA, seu tratamento e acompanhamento serão feitos normalmente. Se você aceitar o convite, mas por qualquer motivo mudar de idéia, poderá retirar a sua permissão a qualquer momento. Se você aceitar o convite, poderá pedir explicações sobre a pesquisa ou sobre os exames a qualquer momento, aos pesquisadores responsáveis pelo projeto, a qualquer momento.

Garantia de sigilo: Os resultados de seus exames serão colocados em um computador e só os pesquisadores terão acesso a eles. Os resultados dessa pesquisa serão publicados em revista científica, dissertação de mestrado e apresentados em congressos científicos, mas a identidade de cada um dos pacientes participantes será mantida em segredo e não será divulgada.

Contatos com o pesquisador responsável/ demais pesquisadores: Dr. Wagner Luiz Tafuri (Departamento de Patologia Geral-ICB/UFMG, pesquisador responsável), contatos: telefone - (31) 3409-2889, celular – (31) 9903- 1565, e-mail: wagner@icb.ufmg.br. Endereço: Avenida Antonio Carlos, nº 6627, Bairro Pampulha, CEP:

31270-901 - Belo Horizonte, MG – Brasil.

Demais pesquisadores: Dra. Maria Norma Melo (Departamento de Parasitologia-ICB/UFMG, co-orientadora), contatos: telefone - (31) 3409- 2850, celular: (31) 9983-2685, e-mail: normamello@gmail.com. Endereço: Avenida Antonio Carlos, nº 6627, Bairro Pampulha, CEP: 31270-901 - Belo Horizonte, MG – Brasil.

Dra. Cibele Fontes Alves (Departamento de Patologia Geral-ICB/UFMG - aluna de mestrado), contatos: telefone: (31) 3409-2889, celular: (31) 8797-7384, e-mail: cibelefontesalves@gmail.com, Endereço: Avenida Antonio Carlos, nº 6627, Bairro Pampulha, CEP: 31270-901 - Belo Horizonte, MG – Brasil.

Assinatura/rubrica do paciente participante

Assinatura/rubrica do pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG): Av. Antônio Carlos, 6627, Campus da UFMG, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005. Tel.: (31) 3409-4592.

Consentimento: Declaro que concordo em participar desta pesquisa e que li, entendi as informações deste documento e discuti todas as minhas dúvidas antes de assinar este documento.

Data: ____/____/20____.

Nome, data de nascimento, endereço, telefone e assinatura do paciente participante.

Nome e assinatura do pesquisador.

Anexo 4



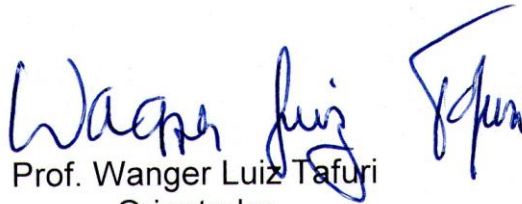
**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



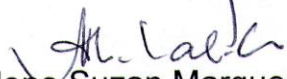
DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Wagner Luiz Tafuri, Pedro Raso, Fernando Tobias Silveira e Marilene Suzan Marques Michalick, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO IMUNO-HISTOQUÍMICO PARA CONFIRMAÇÃO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR”**, apresentada pela mestrandia **CIBELE FONTES ALVES** para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 14 de setembro de 2011.


Prof. Wagner Luiz Tafuri
Orientador


Prof. Pedro Raso
Coorientador


Prof. Fernando Tobias Silveira


Prof. Marilene Suzan Marques Michalick