

Universidade Federal de Minas Gerais

Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina

**Eficácia de um protocolo imuno-histoquímico para detecção de *Leishmania*
em pacientes com diferentes formas clínicas de leishmaniose tegumentar**

Fernanda Aragão Grassi Marques

**Belo Horizonte
2015**

Fernanda Aragão Grassi Marques

Eficácia de um protocolo imuno-histoquímico para detecção de *Leishmania* em pacientes com diferentes formas clínicas de leishmaniose tegumentar

Dissertação apresentada como exigência para obtenção do grau de Mestre em Patologia Investigativa, Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Professor Wagner Luiz Tafuri

Co-orientadora: Professora Maria Norma Melo

**Belo Horizonte
2015**

COLABORADORES:

Professora Célia Maria Ferreira Gontijo (Fundação Oswaldo Cruz – Minas Gerais)

Professor Fernando Tobias Silveira (Instituto Evandro Chagas - Pará)

Professora Fátima Ribeiro Dias (Universidade Federal de Goiás)

Professor Sydnei Magno da Silva (Universidade Federal de Uberlândia)

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”. (Aristóteles)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos que me ajudaram nesse desafio. Professor Wagner Tafuri, com seus ensinamentos de patologia, exemplo de sabedoria e humildade. Ao meu marido Diego Rafael, meus pais, irmãos, familiares e amigos pelo incentivo e companherismo, sempre presentes. Carolina Carvalho, Gregório Almeida, Vânia Silva e equipe do Laboratório de Patologia de Leishmanioses pela assistência em todas as etapas do processo. Professora Norma Melo pela orientação. Professora Célia Gontijo e sua equipe da FIOCRUZ Minas Gerais por me conduzirem em uma expedição memorável. Professor Fernando Silveira e aos demais colaboradores pela parceria e confiança.

Agradeço a oportunidade de tentar construir conhecimento e suscitar discussão sobre a negligência com os doentes, com a pobreza, com a falta de diagnóstico e tratamento.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram com minha formação e despertaram em mim a capacidade de pensar sobre os problemas.

Aprendi muito.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana é doença infectoparasitária em que amastigotas do gênero *Leishmania* infectam células do sistema fagocítico mononuclear e geram lesões em pele e mucosas. O diagnóstico têm como base evidências clínicas e epidemiológicas, mas deve ser comprovado pela demonstração do parasito. O tratamento efetivo deve ser iniciado para abreviar a evolução da doença e evitar lesões desfigurantes e sequelas. O objetivo do trabalho foi testar a eficácia de método diagnóstico imuno-histoquímico que utiliza como anticorpo primário soro de cão naturalmente infectado com *Leishmania Infantum chagasi*. O método, já padronizado, se mostrou eficaz em trabalho anterior realizado em pacientes do município de Caratinga, Minas Gerais. Através de colaborações foram analisadas amostras de 75 pacientes, de oito estados da federação, todas as amostras testadas tiveram reação de PCR positiva para *Leishmania*. A maioria dos pacientes da amostra eram do sexo masculino, com idade entre 31 e 45 anos, trabalhadores rurais. O local mais frequente de lesão foi perna e em seguida braço. Observamos positividade na técnica descrita em 69,30% dos casos. Não houve correlação estatisticamente significativa entre as formas clínicas, as características histológicas, a presença de necrose, o tempo de evolução da doença e a positividade na técnica proposta. Houve maior positividade na imuno-histoquímica entre os pacientes com intradermorreação de Montenegro negativa ($P= 0,0474$). Conclui-se que a técnica de imuno-histoquímica testada é eficaz para o diagnóstico de LTA, em diversos estados brasileiros, de fácil execução e baixo custo.

Palavras-chave: leishmaniose tegumentar imuno-histoquímica *Leishmania sp.* diagnostico epidemiologia

ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis, is infectious disease in which the amastigotes of *Leishmania* protozoan infect the mononuclear phagocyte system cells and generate lesions in the skin and mucous membranes. The diagnosis are based on clinical and epidemiological evidence, but must be confirmed by demonstration of the parasite. Effective treatment should be initiated to shorten the course of the disease and avoid disfiguring injuries and sequelae. The objective was to test the eficácia of immunohistochemical diagnostic method that uses dog serum naturally infected with *Leishmania Infantum chagasi* as primary antibody. The method has been already standardized and was effective in previous work performed on patients in the city of Caratinga , Minas Gerais. Through collaborations, 75 patient samples were analyzed in eight states of the federation, all the tested samples had positive PCR for *Leishmania*. Most of the patients were men, aged 31 to 45, rural workers. Positivity were observed in the procedure in 69.30 % of the cases. There was no significant correlaçã between clinical forms, histological features, presence of necrosis, progression of the disease and positivity in the proposed technique. There were more positive cases in immunohistochemistry in patients with negative Montenegro skin test ($P = 0.0474$). We conclude that the immunohistochemical technique tested is effective in diagnosing ATL, has easy implementation and low cost.

Keywords: leishmaniasis immunohistochemistry *Leishmania sp.* diagnosis epidemiology

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Distribuição geográfica da procedência dos pacientes33

FIGURA 2: Corte histológico de fragmento de pele de pacientes com leishmaniose tegumentar americana (LTA) com testes parasitológicos positivos para *L. braziliensis*: (A) Observar intensa hiperqueratose (cabeça de seta); (B) notar acantose caracterizada pelo espessamento da epiderme (traço) e inflamação intensa e difusa na derme (triângulo). (C) detalhe da figura anterior demonstrando a degeneração hidrópica na epiderme (cabeça de seta) e edema intercelular (seta preta). Hematoxilina-Eosina (HE). (Ep) Epiderme; (De) Derme; Barras: (A)62 µm, (B) = 32 µm; (C) = 16 µm.....47

FIGURA 3: Corte histológico de fragmento de pele de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) com testes parasitológicos positivos para *L. braziliensis*: (A) Na derme observar infiltrado inflamatório de mononucleares constituído por plasmócitos (seta negra), macrófagos (seta branca) e linfócitos (cabeça de seta). (B) Presença de células gigantes (setas grandes), mas sem a formação de granuloma. (C) Ao centro da figura observar célula gigante com seus núcleos desorganizados conferindo o aspecto de célula gigante do tipo corpo estranho (seta negra). Mais acima notar célula gigante com seus núcleos organizados em forma de ferradura denotando a célula gigante do tipo Langhans (seta branca). Hematoxilina-Eosina (HE). (Ep) Epiderme; (De) Derme; Barras (A-C) = 16 µm48

FIGURA 4: Corte histológico de fragmento de pele de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) com testes parasitológicos positivos para *L. braziliensis*: (A) Ao centro da figura observar infiltrado inflamatório intenso na derme, mas sem a formação de granuloma. Em (B) infiltrado inflamatório de mononucleares associado a necrose das fibras colágenas. Essas mostram-se ora eosinofílicas de aspecto hialino (setas negras) ou esfaceladas (seta branca). Observar vasos sanguíneos com parede eosinofílica caracterizando hialinose (cabeças de setas). (C) Presença de formas amastigotas de *Leishmania* imunomarcadas (marrom) associadas a degradação colagênica (setas negras). (A,B) Hematoxilina-Eosina (H&E); (C) Método imuno-histoquímico da peroxidase. Barras (A) = 32 µm; (B,C) = 16 µm49

FIGURA 5: Corte histológico de fragmento de pele de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) com testes parasitológicos positivos para *L. braziliensis*. (C) Corte histológico de fragmentos de pele de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) com testes parasitológicos positivos para *L. amazonensis*. (A) Ao centro da figura observar a formação de granuloma constituído por uma célula gigante (seta branca); células epitelióides (setas negras) e linfócitos (cabeças de seta); (B) Granuloma constituído basicamente pelos macrófagos de aspecto epitelióides (cabeça de seta) com presença de alguns linfócitos (setas negras) e algumas formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* (setas brancas); (C) Notar agregado de macrófagos intensamente parasitados formando o chamado *Granuloma de Virchow* (linha contínua circunscrita em negro). (A,B) Hematoxilina-Eosina (H&E); (C) Método imuno-histoquímico da peroxidase. Barras (A-C) = 16 µm.....50

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Diagnóstico diferencial da leishmaniose cutânea.....	15
QUADRO 2: Descrição das características de cada grupo histológico.....	25

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Procedência dos pacientes por estado da federação.....	32
TABELA 2: Análise da forma clínica de acordo com o resultado da imuno-histoquímica...	41
TABELA 3: Análise da IDRM e o resultado da Imuno-histoquímica.....	42
TABELA 4: Correlação entre o tempo de evolução e o resultado da IHQ.....	43
TABELA 5 : Correlação entre o subgênero da <i>Leishmania</i> e o resultado da imuno-histoquímica.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Distribuição dos 75 pacientes por faixa etária.....	34
GRÁFICO 2: Frequência dos gêneros masculino e feminino na amostra.....	34
GRÁFICO 3: Distribuição da ocupação dos pacientes da amostra.....	35
GRÁFICO 4: Frequência das formas clínicas dos 75 pacientes da amostra.....	36
GRÁFICO 5: Distribuição do número de lesões por paciente.....	36
GRÁFICO 6: Distribuição das lesões de acordo com o segmento corporal.....	37
GRÁFICO 7: Distribuição do tempo de evolução em 65 pacientes da amostra.....	38
GRÁFICO 8: Frequência dos resultados da IDRM	38
GRÁFICO 9: Distribuição das classificações histológicas 1, 2 e 3 dentre as 75 amostras analisadas.....	39
GRÁFICO 10: Frequência de necrose nas 75 amostras analisadas.....	39
GRÁFICO 11: Distribuição do subgênero <i>Viannia</i> e das espécies <i>Leishmania (V.) shawi</i> e <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	40
GRÁFICO 12: Resultado da imuno-histoquímica nas 75 amostras analisadas.....	41
GRÁFICO 13: Positividade da IDRM na formas clínicas cutânea e mucosa.....	42
GRÁFICO 14: Resultado da imuno-histoquímica entre amostras com presença e ausência de necrose.....	44
GRÁFICO 15: Distribuição da positividade e negatividade da imuno-histoquímica entre amostras com classificação histológica um, dois e três.....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 ALGUNS ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS.....	12
1.2 DIAGNÓSTICO.....	17
2 JUSTIFICATIVA.....	21
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 OBJETIVO GERAL.....	22
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 POPULAÇÃO EXAMINADA.....	23
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DE AMOSTRAS.....	24
4.3. TESTE DE INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO (IDRM).....	24
4.4. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	25
4.5 OBTENÇÃO DO SORO HIPERIMUNE DE CÃO USADO COMO ANTICORPO PRIMÁRIO PARA OS ENSAIOS IMUNO - HISTOQUÍMICOS.....	25
4.6 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DAS FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA SP.</i> NAS BIOPSIAS DE PELE.....	26
4.7 REAÇÃO DE CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	26
4.7.1 PARA AMOSTRAS ORIUNDAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS..	27
4.7.2 PARA AMOSTRAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.....	28
4.7.3 PARA AMOSTRAS DO NORTE DE MINAS GERAIS.....	28
4.7.4 PARA AMOSTRAS ORIUNDAS DO INSTITUTO EVANDRO CHAGAS/PARÁ.	29
4.8 COLORAÇÕES ESPECIAIS.....	30
4.8.1 COLORAÇÃO DE GROCOTT.....	30
4.8.2 COLORAÇÃO DE ZIEHL NEELSEN.....	30
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4.10 APROVAÇÃO EM COMITES DE ÉTICA EM PESQUISA.....	31
5 RESULTADOS.....	32
5.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	32
5.2 ASPECTOS CLÍNICOS.....	37
5.3 RESULTADOS DE EXAMES DIAGNÓSTICOS PARA LTA.....	42
6 DISCUSSÃO.....	51
7 CONCLUSÃO.....	58
8 REFERÊNCIAS.....	59
9 ANEXO 1 APROVAÇÃO EM COMITES DE ÉTICA.....	63
10 ANEXO 2 TABELA DISTRIBUIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DA AMOSTRA.....	66
11 ANEXO 3 TABELA CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS LESOES.....	69
12 ANEXO 4 ANÁLISE LABORATORIAL DAS AMOSTRAS.....	72
13 ANEXO 5 ATA DE DEFESA E FOLHA DE APROVAÇÃO.....	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças, causadas por espécies de protozoários intracelulares obrigatórios, pertencentes ao gênero *Leishmania*, (ROSS, 1903). família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida. Acometem tanto humanos quanto animais, sendo largamente distribuídas em 98 países, em cinco continentes. (ALVAR, 2012) Existem três formas principais da doença: a forma visceral, mais grave, a cutânea, mais comum, e a cutâneo mucosa. Doença relacionada à pobreza, desnutrição e à expansão urbana, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde uma doença negligenciada. (OMS, 2014)

A leishmaniose tegumentar se distribui mundialmente em três regiões principais, cada uma delas responsável por cerca de um terço dos casos. As Américas, Europa e a Ásia ocidental, do Oriente Médio à Ásia Central. Os dez países com maior número estimado de casos são: Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria que, juntos, são responsáveis por 70 a 75% da incidência global estimada. (OMS, 2014)

No novo mundo, a leishmaniose tegumentar, denominada leishmaniose tegumentar americana (LTA), está presente desde a era pré colombiana, sendo distribuída nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil, Vianna (1911) relacionou a doença a uma nova espécie de *Leishmania* que denominou, *Leishmania braziliensis*. (OUMEISH, 1999). Sobre, a evolução da LTA no Brasil, segundo a literatura, observa-se uma expansão geográfica. No início da década de 80, foram registrados casos autóctones em 19 unidades federadas do país e, no ano de 2003, casos de LTA foram confirmados, de forma autóctone, nas 27 unidades federadas. A região Norte vem contribuindo com o maior número de casos, 8.407 no ano de 2013, e maior coeficiente de detecção: 49,5 casos a cada 100.00 habitantes. Já na região sudeste, Minas Gerais ocupa o primeiro lugar em número absoluto de casos. (BRASIL 2014)

Mais de vinte espécies de *Leishmania* são sabidamente infectantes para os humanos e podem ser transmitidas pela picada do flebotômio fêmea do gênero *Lutzomia* (Diptera: *Psychodidae*) (LAINSON et al 1994). O homem, bem como pequenos animais

(roedores) são reservatórios naturais do parasita. Após a hematofagia, a fêmea do flebotomíneo inocula, na pele, a forma flagelada do protozoário, que até então estava na glândula salivar do inseto vetor. Estas promastigotas são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos residentes na pele e se transformam na forma intracelular obrigatória, amastigota. Estas amastigotas, então, replicam dentro do macrófago e são, por fim, liberadas no tecido de onde infectam novas células. O ciclo de vida é completo quando um flebotomíneo, ao se alimentar contrai o parasita. (VON STEBUT *et al*, 2007)

As principais espécies de *Leishmania* causadoras da LTA humana no Brasil são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a mais prevalente, causa lesões cutâneas e mucosas, já descrita do norte até o sul do país, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, que causa predominantemente lesões cutâneas ulcerativas, e ocorre na Amazônia, sobretudo em áreas de colonização recente e; *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, que causa lesões cutâneas e ocasionalmente a forma difusa da doença. Encontrada na bacia amazônica e também nos estados do Maranhão, Bahia, Minas Gerais e Goiás. As espécies *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Vianna) lindenberg* e *Leishmania (Viannia) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL 2007).

Dentre as espécies do gênero *Leishmania* encontradas em mamíferos, somente um pequeno grupo também infecta e leva ao desenvolvimento da LTA no homem, o que, certamente se deve a uma combinação de fatores, incluindo a susceptibilidade intrínseca do homem à infecção e aos hábitos alimentares dos vetores de cada região. A combinação da espécie infectante e os mecanismos imunológicos do hospedeiro resulta em um amplo espectro de manifestações clínicas, histopatológicas e imunológicas. (SHAW 2003, SILVEIRA *et al* 2004) A forma clínica mais frequente é a leishmaniose cutânea localizada (LC) e está situada, no meio do espectro. Pode ser causada por várias espécies do subgênero *Leishmania* e *Viannia* e, no Brasil, a LC, é causada, preferencialmente, pela *L. (V.) brasiliensis*. Sua forma aguda é localizada em áreas expostas facilmente acometidas pela picada do flebotomíneo. A lesão inicia-se por uma papula no local de inoculação, o período de incubação dura de uma semana a vários meses, com média entre uma semana e três meses. Acredita-se ser o período de incubação menor nos visitantes de áreas endêmicas, quando comparados aos habitantes locais. (KUBBA *at al*, 1987) A pápula persiste e desenvolve formando um nódulo ou uma placa no período de quatro a 12 semanas. Desenvolve-se uma secreção seropurulenta que se seca e dá origem a crosta que quando removida mostra ulceração. Esta morfologia vulcânica

nódulo ulcerativa é característica peculiar da leishmaniose cutânea, não obstante, a morfologia da lesão pode ser eczematóide, em placa, hiperkeratósica, zosteriforme, verrucosa, erisipelóide e esporotricóide, (DOWLATI 1996). Em infecções causadas por *L. (L.) amazonensis* a grande infiltração na borda da lesão dá uma pista sobre o parasita causador, enquanto em lesões causadas por *L. brasiliensis* e outras espécies do subgênero *Viannia*, o infiltrado é mais modesto (SILVEIRA *et al* 2004). Pápulas satélites podem se desenvolver ao redor da lesão primária, representando reação a propagação local do parasita e seus produtos antigênicos. Nódulo subcutâneo único ou múltiplos próximos às lesões de pele, representam a linfangite nodular que pode se desenvolver no local; linfadenopatia regional pode estar presente (relatada principalmente com *L. brasiliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*) (WEIGLE 1996). As lesões de pele são geralmente assintomáticas, exceto quando há infecção bacteriana secundária. A lesão permanece estável por várias semanas até a cura, que começa do centro para a borda, de forma centrífuga, progredindo a velocidade variável em vários meses até cicatriz atrófica. Infecções que persistem por mais de um ou dois anos são consideradas crônicas e têm aumento na morbidade, não apenas pelo longo tempo de doença, mas porque lesões crônicas tendem a ser maiores, mais sintomáticas e mais difíceis de diagnosticar pela ausência ou pequeno número de amastigotas no tecido, envolvendo, assim, vasta gama de diagnósticos diferenciais (QUADRO 1). A lesão é geralmente uma placa eritematosa, indurada, com graus variáveis de verrucosidade e atrofia.

O diagnóstico diferencial da LTA é amplo e as possibilidades se reduzem com a caracterização clínica e laboratorial de cada caso. (SALMAN *et al.*; 1999) (QUADRO 1)

QUADRO 1: Diagnóstico diferencial da leishmaniose cutânea

Forma cutânea aguda	Formas cutânea crônica e recidiva cutis
Picada de Inseto	Lupus vulgar
Impetigo	Hanseníase
Furunculose	Goma sífilítica
Ectima	Sarcoidose
Kerion Celsi	Granuloma facial
Verruga viral	Infiltrado linfocítico de Jessner
ORF (ectima contagioso)	Linfocitoma cutis
Molusco contagioso	Lupus eritematoso discoide
Tuberculose cutânea	Psoríase
Goma sífilítica	Quelóide
Bouba	Granulomatose de Wegener
Granuloma piogênico	
Blastomicose	
Paracoccidiodomicose	
Esporotricose	
Cromblastomicose	
Granuloma de Aquário	
Granuloma de corpo estranho	
Ceratoacantoma	
Carcinoma basocelular	
Carcinoma espinocelular	
Linfomas	
Leucemias	
Metástases cutâneas	

A forma recidiva cutis ou leishmaniose lupóide é uma forma rara e peculiar de leishmaniose crônica associada a *L. braziliensis*. Esta forma recorrente da doença refere-se ao desenvolvimento de novas lesões no interior da cicatriz de uma lesão aguda curada, mimetizando o lúpus vulgar. As lesões aparecem como pápulas eritemato escamosas, ou verrucosas, que podem surgir antes da cura da úlcera clássica ou se desenvolver depois. O número de parasitas destas lesões é escasso e acredita-se que há reativação de parasitas dormentes, com período de dormência que varia de 1 a 15 anos. Em alguns casos, cepas de *Leishmania* diferentes das iniciais foram recuperadas o que pode sugerir mudança no estado de imunidade do hospedeiro e / ou reinfeção exógena. Os pacientes afetados têm uma resposta imune celular vigorosa, mas baixos títulos de anticorpos. (SALMAN 1999)

No extremo hiperérgico e pauciparasitário do espectro está a forma mucosa (FM), também denominada de leishmaniose mucocutânea (LMC). Embora alguns pacientes possam apresentar simultaneamente, lesões de pele e mucosa, foi observado que na maioria dos casos, as lesões mucosas são subseqüentes a infecção cutâneas prolongadas e não tratadas. O agente etiológico mais frequente é a *L. (V.) braziliensis* (SILVEIRA *et al.*; 1999; LAINSON, 1983; LAINSON & SHAW, 1998).

No extremo hiporreativo está a leishmaniose cutânea anérgica difusa (LAD). A doença geralmente começa com uma lesão primária, que evolui para numerosos nódulos ulceradas e placas acometendo outras áreas de pele. As lesões são geralmente indolores e podem se sobressair na face caracterizando uma “facies leonina” que remete àquela da hanseníase virchowiana. Há parco infiltrado inflamatório, apesar de intenso parasitismo, isso se deve a falta de resposta celular específica. Esta forma também é caracterizada pela ausência de envolvimento visceral, resposta parcial ao tratamento, e recaídas frequentes. (SALMAN 1999)

A utilização do termo leishmaniose cutânea disseminada “boderline” para a forma disseminada da doença, causada por parasitas dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* foi proposta por SILVEIRA *et al.*, (2004). Esta forma pode ser considerada intermediária entre leishmaniose cutânea localizada e os pólos extremos de patogenicidade leishmaniose mucosa e leishmaniose anérgica difusa.

1.2 Diagnóstico

O diagnóstico precoce e correto da LTA é fundamental para o estabelecimento de um tratamento efetivo, evitando assim, o desenvolvimento de uma doença crônica, por vezes ocasionando lesões desfigurantes (VAN DER MEIDE et al., 2005). O diagnóstico pode ser feito baseado nos achados clínicos e em dados epidemiológicos, porém deve sempre ser confirmado pela demonstração do parasito, para evitar potenciais erros diagnósticos (MARFURT et al., 2003). Espécimes podem ser obtidos por escarificação da lesão, biopsia por “punch”, biopsia em cunha ou aspiração por agulha fina. Atualmente, os métodos clássicos, usados para a detecção direta do parasito, incluem a visualização de amastigotas por exame de cortes histológicos de fragmentos de biopsias de pele (corados pelo Giemsa ou Hematoxilina-Eosina), realização de cultura *in vitro* do parasito (VAN DER MEIDE et al., 2005; MARFURT et al., 2003; ASHFORD, 2000). Embora o exame com microscopia óptica seja rápido, barato e de fácil execução, o diagnóstico histológico pode ser mal sucedido devido à baixa sensibilidade do método, em virtude do pequeno número de parasitos verificados nas lesões de pele. 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. (FURTADO, 1980; GONTIJO *et al.*, 2003; BRASIL 2007). As técnicas de cultura são mais sensíveis, no entanto, requerem uma sofisticada estrutura laboratorial, além de serem extremamente trabalhosas e demoradas, apresentando ainda grande risco de contaminação (MARFURT et al., 2003).

Os testes sorológicos não são muito úteis para o diagnóstico da LTA, já que os títulos de anticorpos são normalmente não detectáveis ou estão presentes em baixos títulos (SALMAN et al., 1999). Os ensaios de diagnóstico sorológico da leishmaniose mais comumente usados são a imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA. Resultados recentes demonstram melhor desempenho nos ensaios, embora a sensibilidade permaneça baixa, dependendo da preparação de antígeno utilizada. A especificidade para certas espécies dos resultados dos testes sorológicos pode explicar a baixa sensibilidade observada em alguns estudos que utilizaram amostras de áreas em que há muitas espécies diferentes, por exemplo a região amazônica. (GOTO & LINDOSO; 2010)

A intradermoreação de Montenegro (IDRM), teste cutâneo de Leishmanina, mede a reação

de hipersensibilidade tardia à aplicação intradérmica de suspensão de promastigotas, no entanto, não é um sinal de proteção efetiva para a leishmaniose cutânea. É utilizado como ferramenta diagnóstica para a LTA há 50 anos e têm sensibilidade e especificidade aceitáveis, porém, possui diversas causas de falsa positividade. O timerosal, presente na fórmula clássica da solução a ser injetada é comprovadamente alergênico. Fagundes *et al.*, (2007), demonstraram intradermoreação positiva à solução salina com timerosal, em 9,2% de homens jovens de área não endêmica. A IDRm positiva pode ser um bom indicativo de exposição previa aos parasitos causadores de leishmaniose, no entanto, a própria realização repetida do teste pode induzir uma imunossensibilização capaz de conferir positividade ao teste. Em quadros de início recente, a IDRm pode ser negativa, tornando-se positiva com a evolução da doença. Como a resposta imune celular que se desenvolve com a infecção é duradoura, o teste permanece positivo vários anos após a cura clínica. A interpretação deste sinal de imunidade deve ser considerada com cautela, em especial, nas áreas endêmicas. ((FAGUNDES 2007 ; MOMENI BOROUJENI 2013)

Em um extenso e clássico estudo de LTA no Brasil, MAGALHÃES *et al.*, (1986) analisaram biópsias de pele de 378 pacientes infectados com *L. braziliensis* e, através das alterações dérmicas ou do córion da mucosa, identificaram a existência de cinco padrões histopatológicos distintos: 1-reação exsudativa celular; 2-reação exsudativa e necrótica; 3-reação exsudativa e necrótica-granulomatosa; 4-reação exsudativa e granulomatosa e 5-reação exsudativa e tuberculóide. Os parasitos, embora escassos, foram encontrados em 63,7% dos casos de forma cutânea e em 37,5% dos casos de forma mucosa. É importante destacar que, o diagnóstico histopatológico de certeza da LTA só é possível mediante o achado dos parasitos. Caso contrário, as alterações histopatológicas são, no máximo, sugestivas do diagnóstico (MAGALHÃES *et al.*, 1986).

O exame histopatológico de lesões causadas por *L. (L.) amazonensis* mostra infiltrado denso de macrófagos vacuolados na derme repletos de amastigotas, o que dá ao infiltrado a aparência de um “granuloma macrofágico”. (MORAIS E SILVEIRA, 1994). Isso difere da histopatologia em casos de LC causadas por *L. (V.) braziliensis* e outras espécies do subgênero *Viannia*, em que as amastigotas são geralmente escassas. Em contraste, o exsudato celular é constituído preferencialmente de linfócitos e plasmócitos, mais frequentes do que macrófagos. Esses últimos, por sua vez, apresentam-se na forma epitelióides e não raro formando agregados na derme denominados “granulomas epitelióides”. (MAGALHÃES *et al.*, 1986)

Nas últimas décadas, vários ensaios moleculares mediante emprego do método da reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido desenvolvidos para detecção de *Leishmania*. Esses ensaios, frequentemente apresentam alta sensibilidade, variando entre 96% a 100%. (DE OLIVEIRA et al., 2002). A PCR é um método que vem sendo amplamente utilizado para fins de pesquisa. Todavia a PCR ainda não é empregada em em larga escala como rotina de diagnóstico, apesar de muito acrescentar em sensibilidade quando utilizada com os métodos parasitológicos tradicionais. Atualmente estão disponíveis diferentes técnicas: (1) PCR utilizando DNA dos minicírculos: tem sensibilidade de 80 a 94% (material biopsiado da lesão a fresco ou congelado a 20°C) e 69 a 75% em parafina, podendo apresentar 25% de contaminação em ambos os casos. É uma técnica cara e sofisticada porque requer duas salas (uma para extração de DNA e outra para preparo do material da PCR) (2) PCR-RFLP: pode ser usada a região conservada dos minicírculos do kDNA) seguida de corte com a enzima de restrição (RAE 3). É confiável, rápida e fácil. Usa amostras biológicas de hospedeiros, reservatórios e vetores infectados; (3) PCR (G6PhD-Glucose-6-Phosphato-Desidrogenase), tem as vantagens de ser confiável, possível de ser realizada em amostras transportadas em temperatura ambiente e de fácil visualização do resultado positivo ou negativo. É capaz de distinguir o gênero *Leishmania* de *Trypanossoma* e *Sauroleishmania*, os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* e as espécies do subgênero *Viannia*; (4) PCR “Real Time”(tempo real): detecta a transcrição reversa-RNA, que indica infecção ativa, por meio de qualquer uma das técnicas conhecidas de PCR. Apresenta as vantagens de utilizar dados computadorizados, não necessitar de técnico especializado em parasitologia, identificar e quantificar a espécie do parasito, medir as variações sazonais do parasito no hospedeiro silvestre, e, talvez, para determinar a eficácia das drogas na leishmaniose humana e experimental. Tem como desvantagem o alto custo por necessitar de termociclador especial e realizar um volume pequeno de reações. (BRASIL, 2007).

Imuno-citoquímica (ICQ) ou imuno-histoquímica (IHQ) são técnicas que utilizam anticorpos conjugados com marcadores para localizar e identificar estruturas teciduais que funcionam como antígenos *in situ*. A utilização de anticorpos policlonais em IHQ eleva a sensibilidade diagnóstica em doenças infecto parasitárias são mais acessíveis, técnica e economicamente que os anticorpos monoclonais. Estas características têm permitido a aplicação de anticorpos policlonais em IHQ para a identificação de amastigotas integras e antígenos de *Leishmania* em diferentes tecidos humanos e animais. (LUNEDO *at al*; 2011)

A utilização de uma técnica de imuno-histoquímica de baixo custo, alta especificidade e sensibilidade, poderá ser útil, não apenas para estabelecer um diagnóstico de certeza da LTA, mas também para ser aplicado como critério de cura da doença, o que é controverso em casos de leishmaniose tegumentar. (MAYRINK *et al.*, 1992; HERWALDT & BERMAN, 1992; GUEVARA *et al.* 1993). Contudo, o critério clínico pode ser falho, já que vários autores identificaram a presença do parasito em cicatrizes, vários anos após o estabelecimento da cura clínica (MARSDEN *et al.*, 1986; SCHUBACH, 1998). Alves *et al.* (2013), por sua vez, descreveram uma técnica de imunoistoquímica alternativa, que apresentou elevada eficácia e baixo custo em relação às imunoistoquímicas tradicionalmente utilizadas. Essa técnica baseou-se na utilização de soro de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* como anticorpo primário, seguido por um sistema de detecção utilizando um anticorpo secundário biotinizado de cabra anti-camundongo. A utilização do soro de cão quando comparado aos anticorpos monoclonais ou policlonais anti-*Leishmania* tornou a técnica com um menor custo e mais facilmente aplicável. Além disso, o anticorpo secundário utilizado não foi específico para o soro de cão, sendo que o resultado ocorreu devido uma reação cruzada, de acordo com o observado por Tafuri *et al.* (2004). Os resultados deste trabalho indicaram que este método foi tão específico quanto aqueles que utilizam anticorpos monoclonais ou policlonais anti-*Leishmania*, além não apresentar a ocorrência de reações inespecíficas teciduais (*background*). Os autores demonstraram positividade em mais de 90% (91,8%) dos casos da forma cutânea de LTA estudados oriundos da região endêmica do município de Caratinga, MG., sem diferença estatística com os resultados da biologia molecular (PCR).

Alves e colaboradores (2013) além de estudarem apenas casos da forma localizada (formas cutâneas clássicas) de LTA, consideraram apenas pacientes sabidamente positivos para *Leishmania* mediante emprego de vários exames de diagnóstico (sorológico, IDRM, esfregaço de aposição e PCR). É importante dizer que esses autores identificaram apenas *L. braziliensis* como o agente etiológico de todos os casos e que consideraram casos com até três meses de evolução. Assim, o objetivo do presente estudo foi o de investigar a eficácia do método imuno-histoquímico preconizado por Tafuri *et al.* (2004) em pacientes com diferentes formas de LTA e oriundos de diferentes regiões endêmicas do Brasil.

2 JUSTIFICATIVA

A ocorrência de reação cruzada, na imuno-histoquímica do tecido acometido, entre espécies do gênero *Leishmania* é fato descrito na literatura por QUINELLA *et al.* (2009). Em trabalho mais recente, ALVES *et al.* (2013), padronizaram um protocolo de teste imuno-histoquímico descrito por Tafuri *et al.* (2004) em casos de LTA. Esse protocolo preconiza a utilização de soro de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* como anticorpo primário buscando reações cruzadas entre as espécies que causam a LTA. Como já mencionado Alves *et al.* (2013) empregaram esse método em pacientes com LTA que tinham exames sorológicos positivos, IDR positivo e exames parasitológicos positivos (cultura e PCR positivos) para LTA. Além disso, o PCR revelou apenas infecção por *Leishmania braziliensis* para todos os casos. Assim, o objetivo desse trabalho foi o de validar a técnica preconizada por Tafuri *et al.* (2004) em amostras de pele de pacientes com LTA oriundas de outras regiões endêmicas do Brasil, principalmente daquelas onde há maior probabilidade de se encontrar diferentes formas clínicas e/ou casos distintos de LTA e talvez, provocados por outras espécies de *Leishmania*, além da *L. braziliensis*.

A LTA é uma doença em expansão com elevada morbidade. Apresenta dificuldades no que se refere a técnicas diagnósticas e de diagnóstico diferencial. A técnica apresentada tem a vantagem de em trabalho posterior ter possibilitado o diagnóstico em casos de evolução arrastada, quando a chance de demonstração do parasita através da técnica rotineira de HE se torna menos provável e no momento que o diagnóstico diferencial com outras patologias que possuem quadro clínico e histológico semelhante é mais difícil. Existe ainda a vantagem do baixo custo do processo e da maior simplicidade de execução quando comparada à PCR, fazendo com que haja maior possibilidade de utilização em centros de atenção secundária. Desta forma a técnica em estudo poderá ajudar na decisão terapêutica acertada uma vez que a leishmaniose é doença cujo tratamento possui efeitos colaterais importantes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- ✓ Avaliar a eficácia da reação imuno histoquímica no diagnóstico laboratorial das diferentes formas clínicas de LTA no Brasil

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Correlacionar a localização, forma clínica e tempo de evolução das lesões e sua influência na positividade na técnica de imuno-histoquímica proposta

- ✓ Avaliar a positividade da Intradermoreação de Montenegro entre os pacientes estudados e comparar a técnica imunohistoquímica descrita em pacientes com intradermoreação de Montenegro positiva e negativa.

- ✓ Avaliar as alterações histológicas na pele de pacientes com leishmaniose tegumentar americana, provenientes de diversos estados brasileiros.

- ✓ Validar a técnica imuno-histoquímica, já padronizada, para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana, baseada na reação cruzada com soro de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, em amostras de pele de pacientes com LTA, oriundos de diversas regiões endêmicas

- ✓ Avaliar a acurácia da técnica imuno-histoquímica proposta comparando os resultados obtidos com técnica da Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) para identificação do complexo *Leishmania*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. População examinada

A população estuda compreendeu setenta e cinco amostras. O estudo teve caráter retrospectivo com uso de material previamente coletado ou referenciado aos nossos colaboradores, no Pará, Góias e Uberlândia, e prospectivo com as amostras que foram coletadas nas cidades de Januária e São João das Missões, Minas Gerais no período do estudo, conforme descrito a seguir:

(1) Amostras para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da LTA provenientes de pacientes atendidos pelo CREDESH - Centro de Referência Nacional em Hanseníase/Dermatologia Sanitária, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

(2) Amostras de pele de pacientes atendidos no ambulatório do Laboratório de Leishmanioses “Prof. Dr. Ralph Lainson”, Departamento de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas (IEC), Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS, Brasil), na cidade de Ananindeua, estado do Pará, onde são realizadas avaliação clínico-epidemiológica e laboratorial (confirmação parasitológica, incluindo o isolamento e a caracterização específica da cepa de *Leishmania* spp. envolvida, e reação intradérmica de Montenegro).

(3) Amostras de pacientes atendidos no ambulatório do Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad, Goiania, que, por se tratar de hospital referencia, atende pacientes encaminhados de outros estados.

(4) Foi realizada uma expedição ao Norte de Minas Gerais em parceria com a Fundação Oswaldo Cruz, Minas Gerais (FIOCRUZ – Instituto Rene Rachou). Foi realizado atendimento no Centro Avançado de Tratamento e Pesquisa em Leishmaniose de Januária e na Unidade Básica de Saúde de Itapicurú, localizado na Terra Indígena Xakriabá, município de São João das Missões. Os pacientes em investigação diagnóstica de lesões cutâneas suspeitas foram biopsiados e as amostras submetidas a exames investigativos para isolamento do parasita, os resultados foram devolvidos às localidades para benefício dos pacientes.

4.2 Critérios de Inclusão de Amostras

Amostras de pele e mucosa de pacientes com diagnóstico de LTA foram confirmadas pela Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) e incluídas. Todavia, foram incluídos pacientes com Intradermorreação de Montenegro (IDRM) positiva, negativa e não realizada. Apesar de ter sido realizado em algumas amostras, o exame parasitológico direto (exame de aposição) não foi considerado para fim de inclusão ou exclusão de amostras.

O número, a localização das lesões, o tempo de evolução até o momento da biopsia, idade, sexo, ocupação e procedência dos pacientes foram dados a ser avaliados. Ausência, de uma ou mais informações, não foi motivo de exclusão exceto pela informação quanto a localização das lesões.

Pacientes que não possuíam especificação da localização da lesão biopsiada de modo a permitir a classificação entre forma cutânea (FC), forma mucosa (FM), forma cutânea disseminada (FCD) e forma difusa (FD) não foram incluídos nesse estudo. A classificação quanto a forma clínica foi feita com base nos relatos do prontuário, tendo sido considerado como forma mucosa as amostras cujo local biopsiado era a mucosa. Os pacientes em questão foram questionados quanto a sua ocupação, aqueles que se descreveram como vaqueiros, lavradores, produtores rurais foram englobados na descrição trabalhador rural. As outras ocupações foram descritas como de área urbana, ou como o próprio paciente a denominou quando se tratou de estudante, do de lar, servidor público.

4.3. Teste de Intradermorreação de Montenegro (IDRM)

O antígeno de Montenegro é 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). O volume de 0,1mL do antígeno com 40µg/mL de nitrogênio(MELO *et al.*, 1977; MAYRINK *et al.* 1993A) é injetado intradermicamente na face interna do antebraço direito de cada paciente. A positividade é indicada pela formação de pápula ou nódulo, com diâmetro superior a 05mm (cinco milímetros), analisado após 48 horas da inoculação do antígeno e aferido por paquímetro.

4.4. Avaliação Histopatológica

A avaliação do tipo do infiltrado inflamatório foi realizada nos cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina (HE) e solução de Giemsa a 10%.

A classificação do infiltrado inflamatório foi então simplificada em três divisões distintas conforme Quadro 2. As amostras foram ainda classificadas quanto à presença ou ausência de necrose.

QUADRO 2: Descrição das características de cada grupo histológico

Grupo	Características
1	Reação exsudativa-celular (REC): infiltrado inflamatório com plasmócitos, macrófagos e linfócitos (plasmohistiolinfocitário) na ausência de células gigantes e áreas de necrose
2	Reação exsudativa-necrótica (REN): infiltrado granulomatoso desorganizado com células gigantes sem, no entanto, formar granulomas coesos, com áreas de necrose.
3	Reação exsudativa-necróticagranulomatosa (RENG): presença de granulomas tuberculóides, com áreas de necrose.

Fonte: (MAGALHÃES et al.; 1986, p.) Nota: Modificado

4.5 Obtenção do soro hiperimune de cão usado como anticorpo primário para os ensaios imuno - histoquímicos

O soro hiperimune foi obtido de cão naturalmente infectado por *L. infantum*, pertencente ao canil do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, obtidos do centro de controle de zoonoses da cidade de Ribeirão das Neves e que fazem parte de várias linhas de pesquisa sobre LVC do Departamento de Patologia e de Parasitologia/ICB/UFMG. O soro é triado através de reação imunológica. Amostras com títulos superiores a 1:1240, são consideradas adequadas para a utilização como anticorpo primário.

4.6 Técnica de imuno-histoquímica para detecção das formas amastigotas de *Leishmania sp.* nas biopsias de pele

O protocolo do método imuno- histoquímico empregado foi o preconizado por Tafuri *et al.* (2004). Lâminas contendo cortes parafinados de fragmentos de pele ou mucosa foram hidratadas e submetidas aos banhos em PBS. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (30 volumes) a 4% (30 minutos em temperatura ambiente). Reações inespecíficas foram bloqueadas (relacionadas ao anticorpo secundário) com leite em pó (caseína) a 6% em PBS, em câmara úmida por 30 min em temperatura ambiente, com lavagem em PBS 1X. Os cortes foram incubados com soro primário por 1 hora em câmara úmida a 4°C. Posteriormente o polímero ((kit DAKO –ADVANCE HRP – K4068), segundo Alves *et al.* foi adicionado por 30 minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida. O complexo estreptoavidina peroxidase (kit DAKO) foi adicionado por 30 min em câmara úmida à temperatura ambiente. A revelação foi feita com a adição da solução reveladora Diaminobenzidina (DAB) a 0,024%, acrescida de solução de peróxido de hidrogênio por 5 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas em água corrente, contra coradas com Hematoxilina de Harris, lavadas novamente, desidratadas em álcoois crescentes (70°, 80°, 90° e álcool absoluto), diafanizadas em xilol e montadas com Entellan®.

Para marcação das formas amastigotas de *Leishmania* utilizamos soro de cão naturalmente infectado (soro hiperimune) na diluição de 1:50.

O controle negativo foi realizado com PBS no lugar do soro primário. Foi utilizado controle positivo para cada anticorpo.

A visualização das formas amastigotas de *Leishmania* imunomarcadas de *Leishmania* (coradas em marrom) foi realizada por microscopia óptica convencional, sendo as laminas classificadas como positivas ou negativas.

4.7 Reação de Cadeia da Polimerase (PCR)

A demonstração do material genético da *Leishmania sp.* foi realizada com diferente metodologia a depender da origem da amostra. Evita-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.

4.7.1 Para amostras oriundas da Universidade Federal de Goiás:

Primeiro, o PCR foi realizado para detectar o gênero *Leishmania* (para o diagnóstico de leishmaniose), então a cadeia de polimerase polimorfismo de fragmentos de reação de restrição (PCR-RFLP) foi utilizada para identificar o subgênero da *Leishmania*. Os lisados de tecido foram obtidos a partir de congelado fragmentos de biópsia por adição de 25 µl de TE (10mM Tris - HCl , 1 mM de EDTA , pH 8,0) , e proteinase K (100 ug / ml) , em 56 ° C , durante 3 h . O DNA foi extraído utilizando o illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK), tal como recomendado pelo fabricante. A PCR foi efetuada utilizando um 1 µM de cada primer (a região conservada de minicírculos de kDNA) , 150 : 5- GGG (G / T) AGGGGCGTTCT (C / G) e 3- CGAA 152 : 5- (C / G) (C / G) (C / G) (A / T) CTAT (A / T) TTACACCAA CCCC 3- , em conjunto com 200 µM de dNTP , incluindo dUTP em vez de dTTP , 0,8 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) , tampão (10 mM Tris - HCl pH 8,6 , KCl 50 mM , 1,5 mM de MgCl₂) e 1 µl de molde de DNA , em um volume final de 10 ul . A amplificação foi realizada no Eppendorf PTC - 100, usando um passo de desnaturação inicial a 94 ° C durante 5 minutos, seguido de 29 ciclos a 94 ° C durante 1 minuto, 59 ° C durante 45 segundos , 72 ° C durante 30 segundos e uma etapa final de extensão de 7 minutos. Os produtos de PCR foram corridos num gel de poliacrilamida a 8 % no Mini Protean - II (Bio - Rad , Hercules , CA , EUA) , seguido de coloração com prata para visualizar as bandas. Controles positivos contendo DNA de *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis* e um controle negativo sem DNA foram incluídos em cada conjunto de reação. Todas as amostras positivas foram submetidas a análise por RFLP do produto de amplificação. Os produtos de PCR (5 µL) foram utilizados para a digestão pela adição de 1 L de Hae III (Invitrogen) durante 3 horas, a 37 ° C . Os fragmentos de restrição foram separados numa poliacrilamida a 10 % gel no aparelho de Mini - Protean II (Bio - Rad) e corado com prata. A digestão de Hae III com o produto de 120 bp PCR de *L. (V.) braziliensis* produzindo dois fragmentos, um de 40 pb e outro de 80 pb sendo que a enzima não digeriu *L. (L.) amazonensis*.

4.7.2 Para amostras da Universidade Federal de Uberlândia:

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 usado 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 implicados iniciadores específicos para o kDNA de espécies do complexo *Leishmania braziliensis*, que amplificam um fragmento de 750 pares de bases (pb) (DE BRUIJN *et al.*, 1992). As reações serão 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’GGGGTTGGTGTAATATAGTGG3’) e B2 (5’CTAATTGTGCACGGGGAGG 3’) de acordo com o descrito por DE BRUIJN *et al.* (1992). As reações foram feitas em um termociclador PTC-100 (MJ Research, EUA). As condições ótimas para a amplificação do DNA que são as seguintes: desnaturação inicial a 96°C por 6 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 em minuto de acordo com o descrito por DE BRUIJN *et al.*; (1992). A PCR foi efetuada utilizando um 1 µM de cada primer (a região conservada de minicírculos de kDNA), 150:5-GGG(G/T) AGGGGCGTTCT (C/G) e 3-CGAA152:5-(C/G) (C/G) (C/G) (A/T) CTAT (A/T) TTACACCAA CCCC 3- , em conjunto com 200 uM de dNTP , incluindo dUTP em vez de dTTP , 0,8 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) , tampão (10 mM Tris - HCl pH 8,6 , KCl 50 mM , 1,5 mM de MgCl₂) e 1 ul de molde de DNA , em um volume final de 10 ul . A amplificação foi realizada no Eppendorf PTC - 100, usando um passo de desnaturação inicial a 94 ° C durante 5 minutos , seguido de 29 ciclos a 94 ° C durante 1 minuto , 59 ° C durante 45 s , 72 ° C durante 30 segundos e uma etapa final de extensão de 7 minutos. Os produtos de PCR foram corridos num gel de poliacrilamida a 8 % no Mini Protean - II (Bio - Rad , Hercules , CA , EUA) , seguido de coloração com prata para visualizar as bandas. Controles positivos contendo DNA de *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis* e um controle negativo sem DNA foram incluídos em cada conjunto de reação.

4.7.3 Para amostras do Norte de Minas Gerais

A presença do parasito foi investigada através da amplificação do DNA isolado diretamente

dos fragmentos de biopsia. Reações de PCR que amplificam um fragmento do gene hsp70 de *Leishmania* foram utilizadas para detectar e identificar o parasito nestas amostras (Garcia *et al.*, 2004).

Os genes codificadores de proteínas de choque térmico de 70 kilodáltons (hsp70) de *Leishmania* são arranjados, in tandem, compreendendo uma família de genes cujas sequências codificadoras em diferentes organismos são altamente conservadas (Folgueira &, Requena; 2007). Aliquotas de 5,0 µL de DNA foram amplificadas utilizando iniciadores que estendem um fragmento de 1300pb do hsp70. A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL utilizando 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP mix (New england), 5,0% DMSO (Invitrogen), 2,5 unidades de Taq DNA polimerase platinum® (Invitrogen), 0,4 pmol de iniciador senso e 0,4 pmol de iniciador anti-senso (IDT, prodimol). Os iniciadores utilizados foram: HSP70 for - 5'GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3' e HSP70 rev 'CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3' (Garcia *et al.*, 2004). A amplificação do DNA molde foi processada em termociclador automático de DNA (marca Eppendorf) alternando 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 61°C por 1 min e extensão a 72°C por 3 min, seguido por um passo de extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 2% corado por brometo de etídeo (8 mg/ml). As amostras que apresentaram a banda específica de 1300 pb foram submetidas à digestão utilizando a enzima HaeIII para análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP). A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 µL, contendo 1µL de HaeIII (New england) (10 U/µL), 1,5 µL de tampão da enzima e 12,5 µL de produto de PCR. A mistura então foi incubada a 37°C por 2 horas. Os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 4% e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas referência de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

4.7.4 Para amostras oriundas do Instituto Evandro Chagas/Pará

A identificação do subgenero e espécie foi realizada na Universidade Federal de São Paulo, através do método de isoenzimas e em quatro casos de *L. (L.) amazonensis* foi feita a confirmação por PCR Hsp70-RFLP.

A identificação dos parasitas foi realizada no Laboratório de Leishmanioses "Prof. Dr. Ralph

Lainson” no Instituto Evandro Chagas-Pará, através do método de isoenzimas e em quatro casos de LTA por *L. (L.) amazonensis* foi feita a confirmação por PCR Hsp70-RFLP (GRAÇA *et al.* 2012) no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50) da Faculdade de Medicina da USP.

4.8 Colorações especiais

Em todas as amostras analisadas foi realizada a coloração de Grocott e de Ziel Nielsen para identificação de fungos e micobacterias, a fim de realizar diagnóstico diferencial com micoses profundas e micobacterioses que, caso encontradas em alguma amostra, esta seria excluída.

4.8.1 Coloração de Grocott

Na coloração de Grocott foi utilizado o kit Easy Path (EP-12-20017) para demonstração de fungos em cortes tissulares. As lamínas foram desparafinizadas em xilol por 5 minutos, hidratadas em álcool 99%, 95%, 70%, lavadas em água corrente, água destilada e secas. Foram colocadas 10 gotas de ácido crômico e deixado por 10 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente por 3 minutos e secas. Foram colocadas 10 gotas de bissulfito e deixado por 30 segundos. As lâminas foram lavadas em água corrente, depois em água destilada e secas. Em um becker, foi feita a junção de 40 ml de água destilada, 40 gotas de metanamina + prata e 20 gotas de bórax. A solução obtida e as lâminas foram colocadas dentro de recipiente termo-resistente com tampa por 40 minutos em estufa (70° C). As lâminas foram lavadas em água destilada e secas. Foram colocadas 10 gotas de cloreto de ouro por 1 minuto. As lâminas foram lavadas em água corrente e secas. Foi colocado 10 gotas de Verde Luz por 1 minuto. As lâminas foram lavadas rapidamente em água corrente e secas. Por último, foram desidratadas em série de álcool ascendente até o xilol e montadas. (GROCOTT, 1955)

4.8.2 Coloração de Ziehl Neelsen

Na coloração de Ziehl Neelsen foi utilizado o kit Labor Clin para coloração de Bacilos Álcool-Ácido Resistentes pelo método de Ziehl-Neelsen em materiais biológicos. A lamina foi coberta com fucsina fenicada de Ziehl-Neelsen e aquecida durante 5 minutos, cuidando para que o líquido não entrasse em ebulição ou secasse. As lâminas foram lavadas

rapidamente em água corrente e descoradas usando a solução descorante, gotejando-a sobre a lâmina inclinada até que não remova mais corante. A seguir as lâminas foram lavadas em água corrente e coradas pelo azul de metileno “Loeffler” por 1 minuto. As lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas para secar na posição vertical. As lâminas foram então levadas ao microscópio e analisadas. Os BAAR (Bacilos Álcool-Ácido Resistentes) coram-se em vermelho contra um fundo azul. (KRASNOW 1969)

4.9 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através dos programas computacionais EXCEL, GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA. Foram utilizados para análise da variância os testes ANOVA TWO WAY para dados paramétricos e, Teste Exato de Fisher's ou Qui-quadrado para dados não paramétricos. Em todos os casos, a diferença estatística foi considerada significativa quando o valor de $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%.

4.10 Aprovação em comites de ética em pesquisa

Esse trabalho tem consentimento do COEP (Protocolo 0227.203.000-11) relacionado ao trabalho em humanos e do CETEA (Protocolo 187/11) relacionado ao uso de soro animal.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos epidemiológicos

Setenta e cinco amostras de pele e mucosa de pacientes com quadro clínico e epidemiológico sugestivo de LTA foram obtidos das diferentes áreas geográficas endêmicas da doença conforme descrito na metodologia. Para todos os casos estudados a reação de PCR para *Leishmania spp* era positiva, sendo que as amostras continham também informação da localização das lesões de forma a permitir a classificação da forma clínica. A procedência dos pacientes se dividiu entre 8 estados brasileiros, sendo desconhecida em 11 dos 75 pacientes. (TABELA 1; FIGURA 1).

TABELA 1: Procedência dos pacientes por estado da federação

Estado	Número de pacientes
Minas Gerais (MG)	17(22,7%)
Pará (PA)	17(22,7%)
Goiás (GO)	13 (17,4%)
Mato Grosso (MT)	07 (09,3%)
Tocantins (TO)	07 (09,3%)
Amazonas (AM)	01 (01,3%)
Bahia (BA)	01 (01,3%)
Maranhão (MA)	01 (01,3%)
Não informado	11 (14,7%)
Total	100%

Divisão das amostras por estado da federação

Em onze casos não foi informado estado de procedência

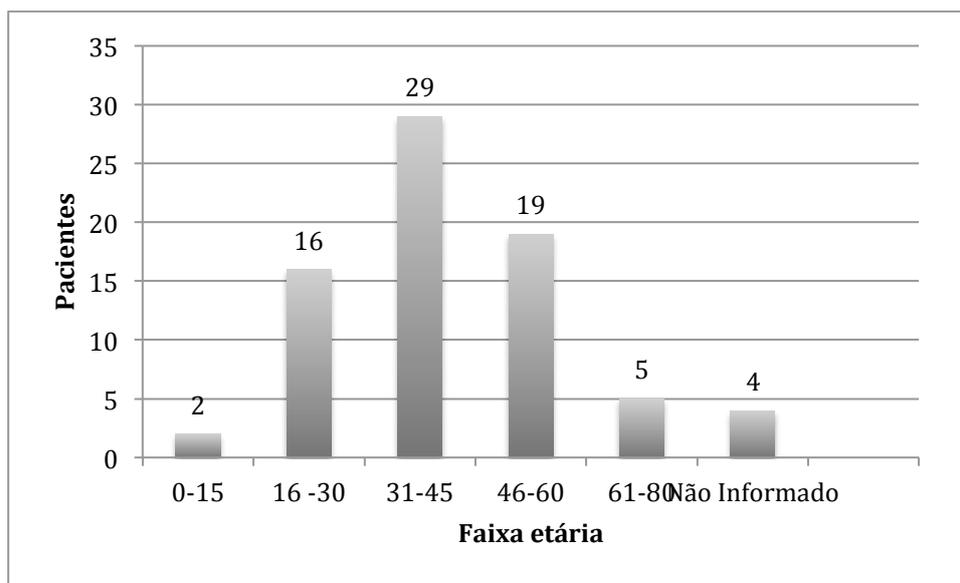


Figura 1- Distribuição geográfica da procedência dos pacientes no mapa do Brasil

Fonte: Autoria própria. Nota: Mapa elaborado com auxílio do Google Maps <https://www.google.com.br/maps/>

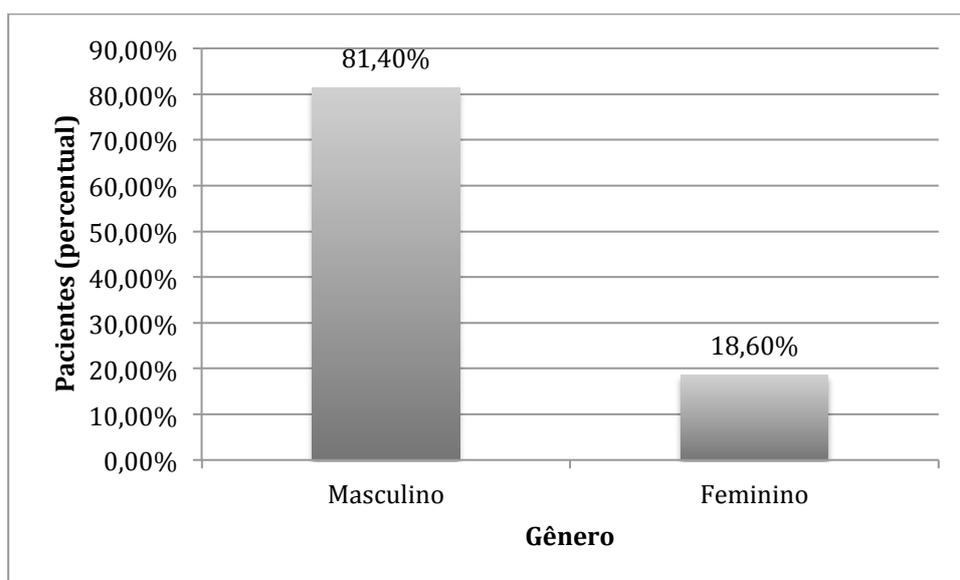
A idade dos pacientes atendidos variou entre 14 e 75 anos, com média de 38,78 anos, mediana de 34 anos e moda de 34 anos. Em 4 dos 75 pacientes, a idade é desconhecida. (GRÁFICO 1). A maioria dos casos, 38,6%, está dentro da faixa etária de 31 a 45 anos. Dos 75 pacientes, 14 (18,6%) são mulheres e 61 (81,4%) são homens. (GRÁFICO 2).

GRÁFICO 1: Distribuição dos 75 pacientes por faixa etária



Distribuição da idade dos pacientes de acordo a faixa etária

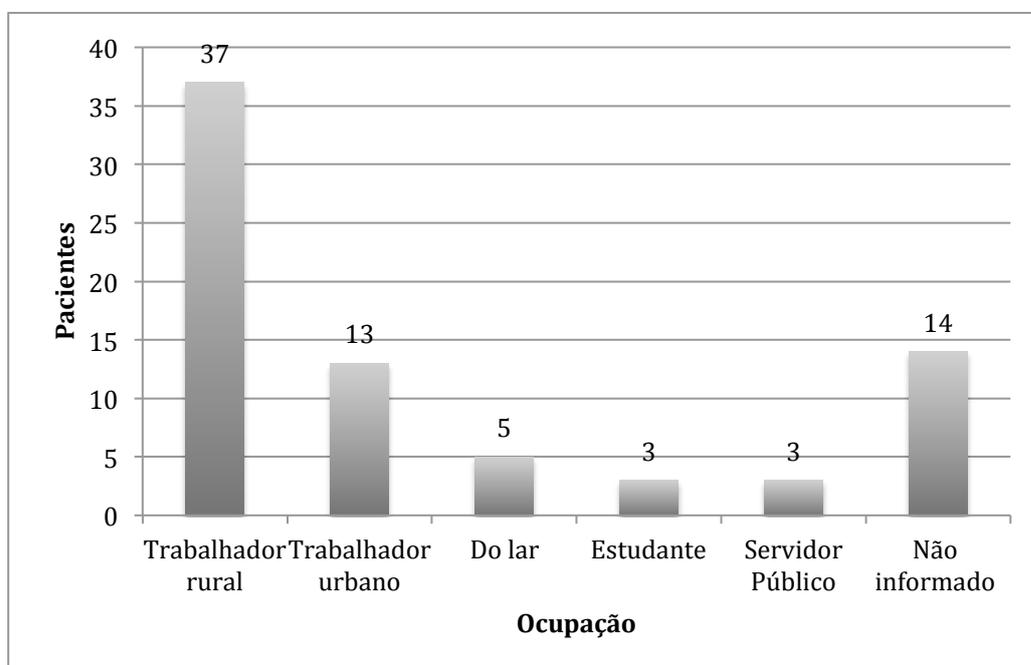
GRÁFICO 2: Frequência dos gêneros masculino e feminino na amostra



Distribuição percentual do gênero dentre os 75 pacientes da amostra

A ocupação dos pacientes se dividiu entre trabalhador rural, 37(49,33%) pacientes, que englobou os que disseram ser lavrador, produtor rural, caçador, vaqueiro e afins; trabalhador urbano, 13 (17,33%) pacientes, que englobou àqueles que se disseram comerciantes, industriários e afins. Classificações separadas foram utilizadas para os estudantes três (4%), as cinco (6,67%) mulheres que se declararam do lar, e três (4%) servidores públicos (por não ser possível precisar se tais atividades são desenvolvidas em ambiente urbano ou rural). Em 14 casos a ocupação é desconhecida. (GRAFICO 3)

GRÁFICO 3: Distribuição da ocupação dos pacientes da amostra



Ocupação dos 75 pacientes da amostra
Em 14 casos a informação não estava disponível

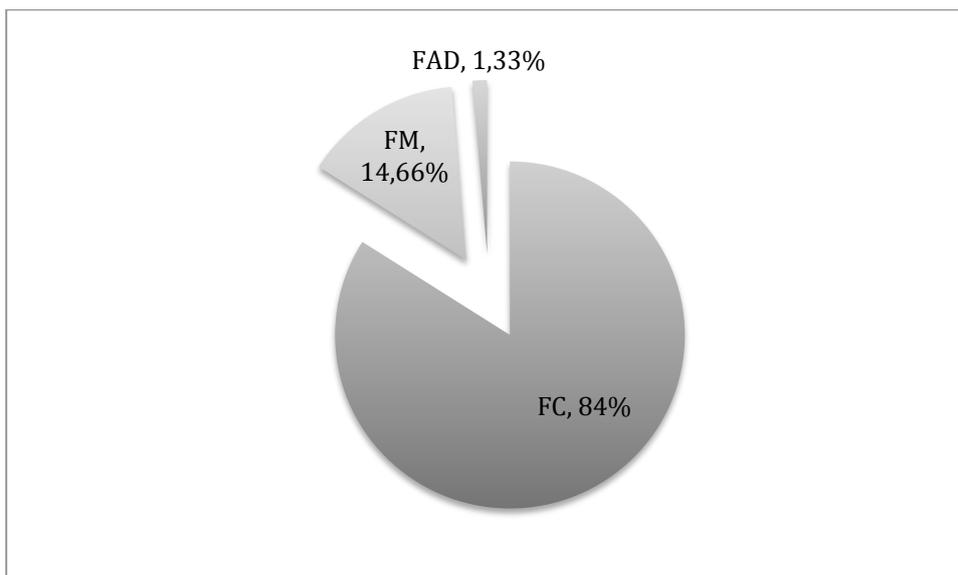
5.2 Aspectos clínicos

As formas clínicas foram divididas da seguinte maneira:

Grupo Forma Cutânea (FC): 63 pacientes (84%) com lesões cutâneas localizadas sem relato de acometimento mucoso, independente do tempo de evolução;

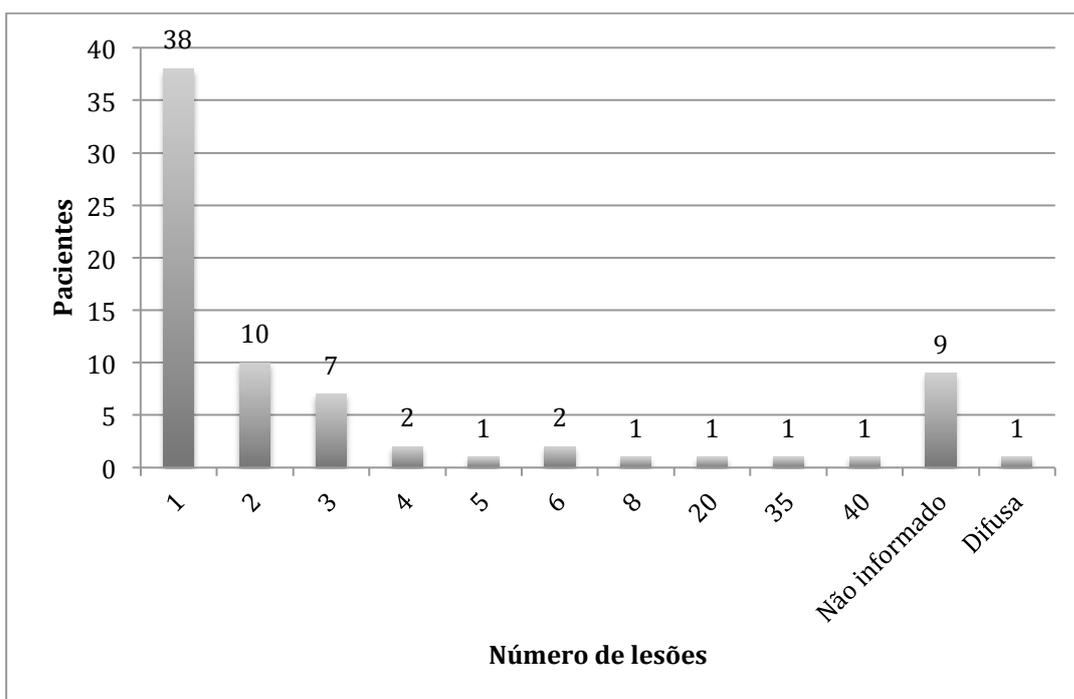
Grupo Forma Mucosa (FM): 11 pacientes (14,66%) com a forma mucosa manifestando uma ou mais lesões;

Grupo Forma Anérgica Difusa (FAD): Um paciente (1,33%), oriundo do estado do Pará, que foi classificado como portador da forma anérgica difusa. (GRÁFICO 4)

GRÁFICO 4: Frequência das formas clínicas dos 75 pacientes da amostra

Formas clínicas de LTA na amostra: Forma cutânea (FC), Forma Mucosa (FM), Forma Anérgica Difusa (FAD)

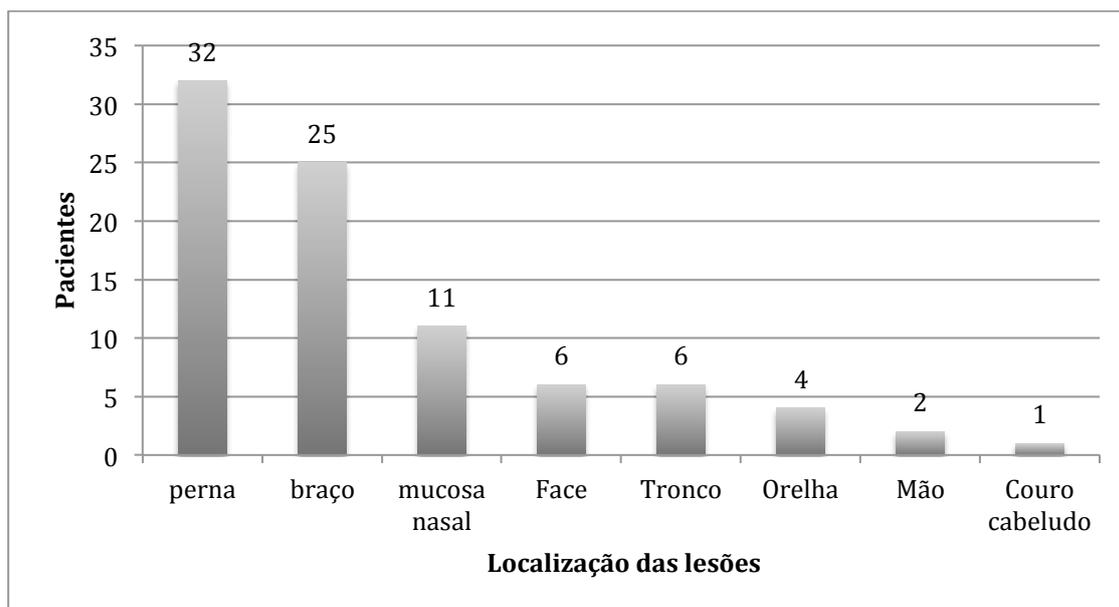
Quanto ao número de lesões houve variação entre uma e 40 lesões, com média de 3,4 lesões por paciente, excetuando-se o paciente com quadro difuso e os nove (12%) em que o dado número de lesões não foi disponibilizado para análise. A mediana foi um, e a moda foi um. (GRÁFICO 5)

GRÁFICO 5: Distribuição do número de lesões por paciente

Distribuição do número de lesões por paciente da amostra

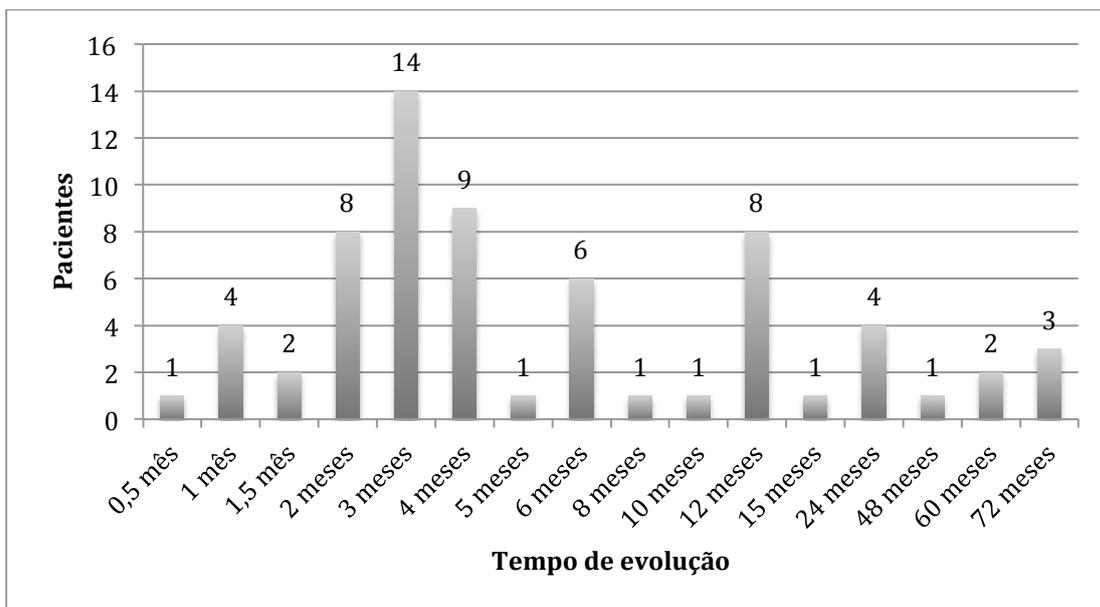
A localização mais frequente foi a perna com 32 lesões, a seguir braço 25 lesões, 11 lesões em mucosa nasal, 6 em tronco e em face, 4 em orelha, 2 em mão e 1 em couro cabeludo. É importante ressaltar que, quando disponível relato da localização de mais de uma lesão em um mesmo paciente, essas foram descritas. Lesões do paciente com a FAD não foram descritas. (GRÁFICO 6)

GRÁFICO 6: Distribuição das lesões de acordo com o segmento corporal



Distribuição da localização corporal das lesões dos pacientes da amostra, em alguns casos havia mais de uma lesão em diferentes localidades

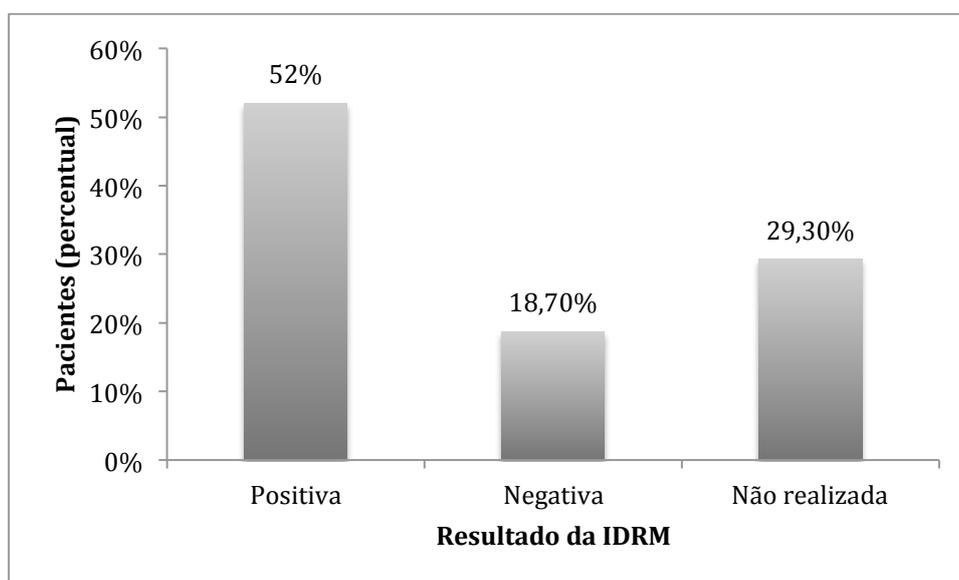
O tempo de evolução das lesões entre o início dos sintomas até a biopsia variou entre 15 dias e 72 meses, com média de 11,56 meses, mediana de quatro meses e moda de três meses. Em nove casos não foi possível obter o tempo de evolução. (GRÁFICO 7)

GRÁFICO 7: Distribuição do tempo de evolução em 65 pacientes da amostra

Tempo de evolução das lesões, em 12 casos o dado não foi informado

5.3 Resultados de exames diagnósticos para LTA

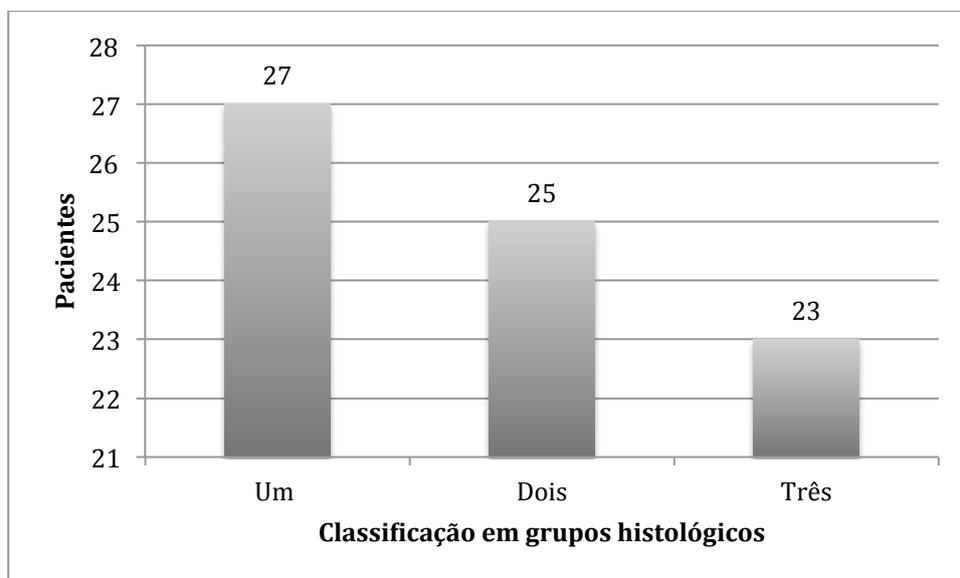
Todos os pacientes incluídos no estudo têm confirmação diagnóstica parasitológica, através de resultado positivo da reação de PCR. Pacientes com IDRMs positiva foi encontrada em 39 casos (52%), sendo 14 casos com IDRMs negativa, e em 22 casos a IDRMs não foi realizada ou não foi disponibilizada para análise. (GRÁFICO 8).

GRÁFICO 8: Frequência dos resultados da IDRMs

Em 22 casos não foi realizada ou não foi disponibilizada para análise

Quanto a classificação histológica as amostras foram separadas em classe 1 em 27 amostras (36%), classe 2 em 25 amostras (33,3%), classe 3 em 23 amostras (30,7%). (GRÁFICO 9)

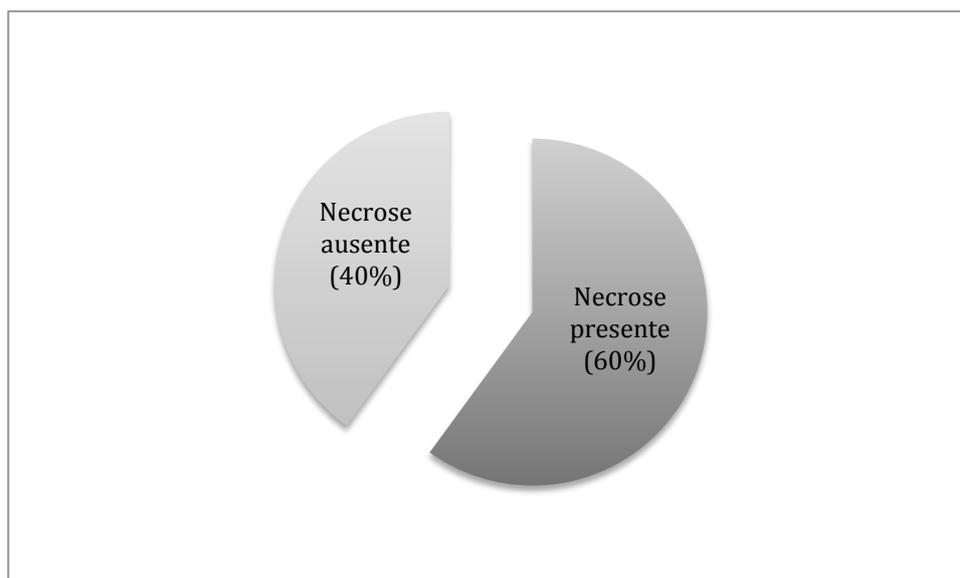
GRÁFICO 9: Distribuição das classificações histológicas 1, 2 e 3 dentre as 75 amostras analisadas



Distribuição das amostras segundo classificação histológica um, dois ou três

Foi avaliada a presença de necrose em 45 pacientes, (60%) e a ausência em 30 pacientes (40%). (GRÁFICO 10)

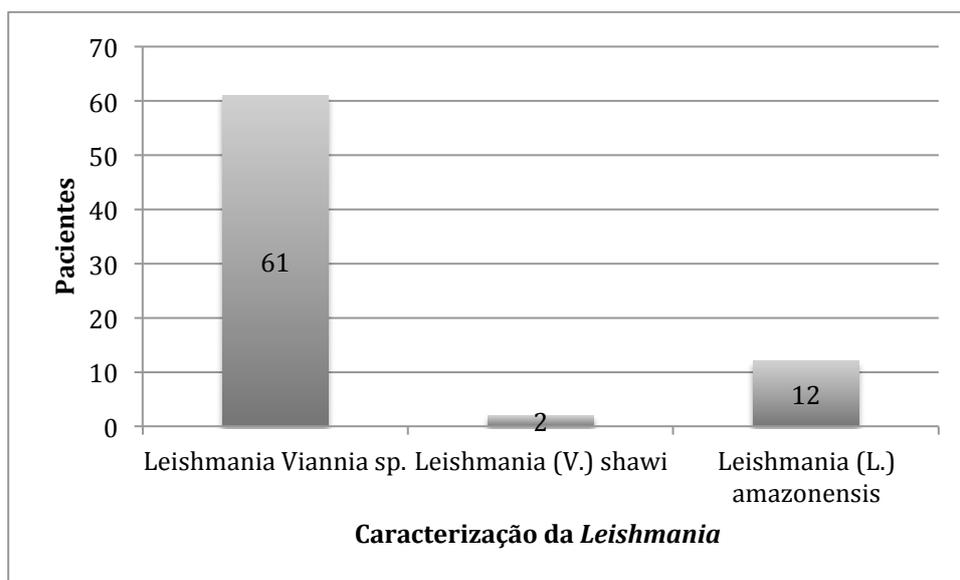
GRÁFICO 10: Frequência de necrose nas 75 amostras analisadas



Distribuição da frequência de necrose entre a amostra

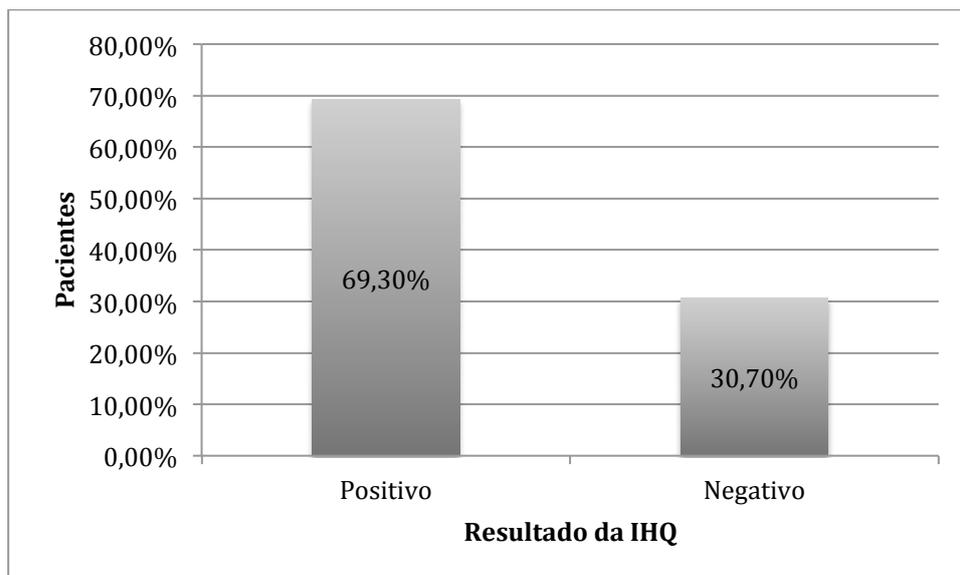
Quanto ao subgênero causador da LTA foram identificadas 63 amostras do subgênero *Viannia*, sendo que em dois casos a espécie foi *Leishmania (V.) shawi* e 12 amostras do subgênero *Leishmania* em todas elas tendo sido diagnosticadas como *Leishmania (L.) amazonensis* (GRÁFICO 11).

GRÁFICO 11: Distribuição do subgênero *Viannia* e das espécies *Leishmania (V.) shawi* e *Leishmania (L.) amazonensis*



Número de pacientes com identificação do subgênero *Viannia*, e espécie *Leishmania (V.) shawi* e *Leishmania (L.) amazonensis* entre a amostra

Quanto à positividade da imuno-histoquímica em 52 amostras (69,33%) foi possível identificar as formas amastigotas de *Leishmania* e em 23 amostras (30,66%) o exame foi negativo. (GRÁFICO 12).

GRÁFICO 12: Resultado da imuno-histoquímica entre as 75 amostras analisadas

Número de pacientes positivos (52) e negativos (23) à IHQ

Ao dividirmos as amostras de acordo com a forma clínica e analisarmos a positividade da técnica de imuno-histoquímica observamos que na forma cutânea 44 (69,84%) amostras foram positivas, na forma mucosa, 7 (63,64%) amostras foram positivas e a única amostra da forma anérgica difusa foi positiva (100%). (TABELA 2)

Não foi observada associação ou correlação entre a imuno-histoquímica e a forma clínica, teste qui-quadrado, $P > 0,05$.

TABELA 2: Análise da forma clínica de acordo com o resultado da imuno-histoquímica

Forma clínica	Imuno – histoquímica		Total
	Positivo	Negativo	
Forma cutânea	44 (69,84%)	19 (30,16%)	63
Forma mucosa	7 (63,64%)	4 (36,37%)	11
Forma anérgica difusa	1 (100%)	0	1
Total	52	23	75

Correspondência entre a forma clínica e o resultado da IHQ nas 75 amostras analisadas

$\chi^2 =$ teste do qui-quadrado $P > 0,05$

Quando observamos a positividade da imuno-histoquímica de acordo com a IDRMM temos que nas amostras com IDRMM positiva, a IHQ é positiva em 29 (74,36%) dos 39 casos. Dentre os

14 casos em que a IDRМ é negativa, 12 (85,71%) casos são positivos na IHQ. Por fim nas 22 amostras em que o resultado da IDRМ é indeterminado, 11(50%) são positivos na IHQ. Foi observada pelo teste quiquadrado uma associação entre a positividade da IDRМ negativa e IHQ positiva. ($\chi^2 = 6,098$, $p = 0,0474$). (TABELA 3)

TABELA 3: Análise da IDRМ e o resultado da Imuno-histoquímica

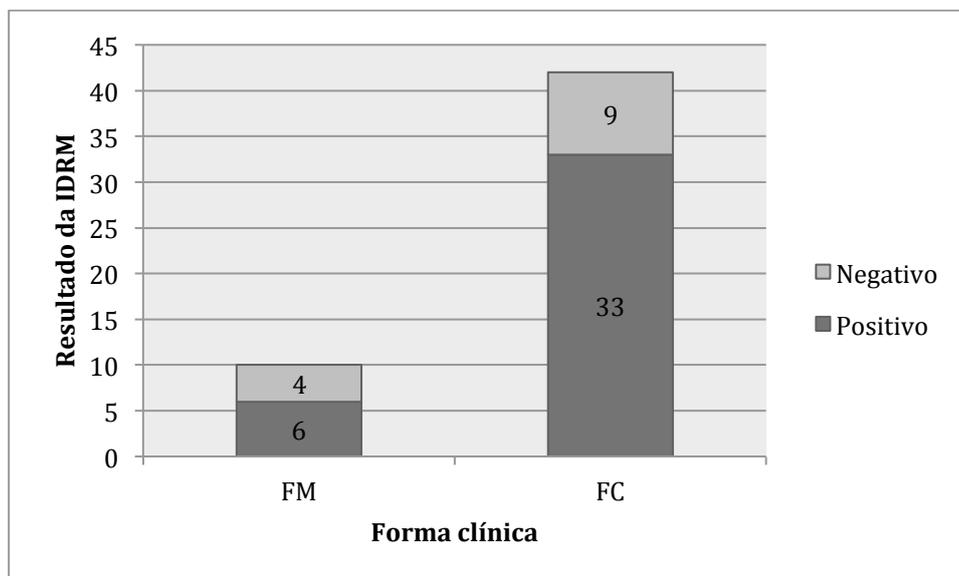
IDRМ	Imuno-histoquímica		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	29	10	39
Negativa	12	2	14
Desconhecida	11	11	22
Total	52	23	75

Correspondência entre a IDRМ e o resultado da IHQ nas 75 amostras analisadas

$$\chi^2 = 6,098 \quad P = 0,0474$$

Pelo teste exato de Fisher's existe uma associação da forma clínica e a positividade da IDRМ ($P = 0,0036$) (GRÁFICO 13)

GRÁFICO 13: Positividade da IDRМ na formas clínicas cutânea e mucosa



Correlação entre a positividade da IDRМ na forma mucosa e na forma cutânea. O caso de forma anérgica difusa não foi analisado por ser único. Em 22 casos a IDRМ não foi realizada.

Ao confrontar o tempo de evolução da doença e a positividade na imuno-histoquímica observamos que das 29 amostras com evolução entre 15 dias e três meses obtivemos 23 (79,31%) positivas. Dentre as 26 amostras com evolução entre quatro e 12 meses, 15 (57,69%) são positivas. Dentre as cinco amostras com evolução entre 13 e 24 meses, quatro (80%) são positivas. Dentre as seis amostras com tempo de evolução maior que 24 meses, cinco (83,33%) são positivas. Dentre as nove amostras com tempo de evolução indeterminado, cinco (55,56%) são positivas. (TABELA 4). Não foi observada associação ou correlação entre a imuno-histoquímica e o tempo de evolução da doença. ($P > 0,05$)

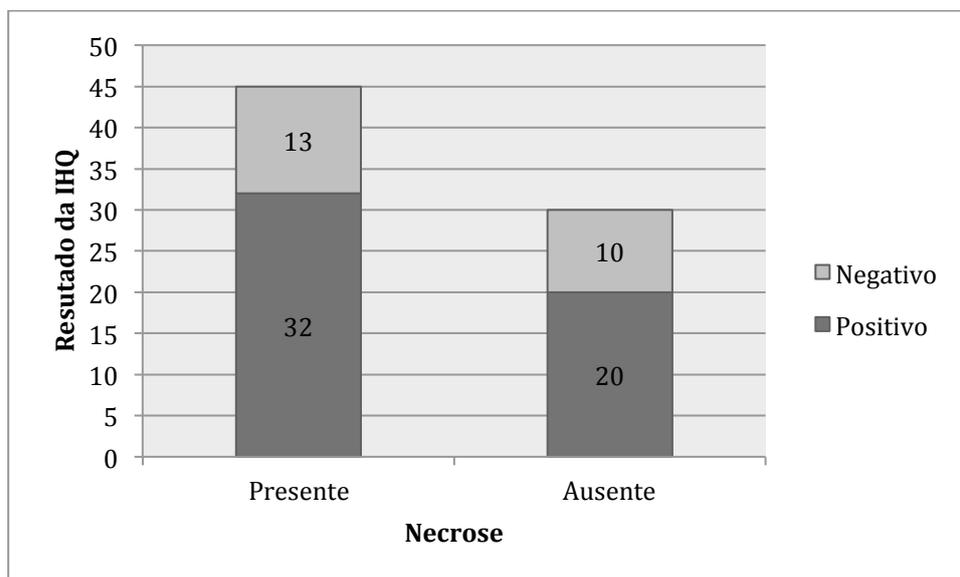
TABELA 4: Correlação entre o tempo de evolução e o resultado da IHQ

Tempo de evolução (meses)	Imuno-histoquímica		Total
	Positiva	Negativa	
0 -3	23	06	29
4-12	15	11	26
13-24	04	01	05
> 24	05	01	06
Desconhecido	05	04	09
Total	52	24	75

Correspondência entre o tempo de evolução e o resultado da IHQ nas 75 amostras analisadas ($p > 0,05$)

Quando analisamos a relação entre a presença de necrose na análise histológica das lesões e a positividade na IHQ, observamos que dentre as 45 amostras com presença de necrose, 32(71,11%) são positivas na IHQ. Dentre as 30 amostras com ausência de necrose 20(66,66%) são positivas. (GRÁFICO 14). Não houve associação pelo teste do qui-quadrado $P > 0,05$.

GRÁFICO 14: Resultado da imuno-histoquímica entre amostras com presença e ausência de necrose

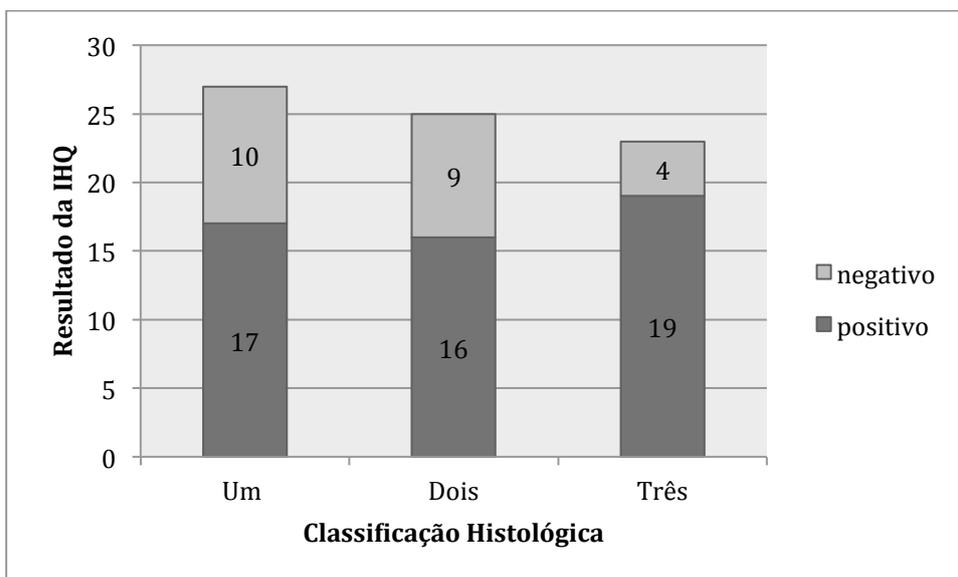


Correlação entre a presença e ausência de necrose, à análise histológica e o resultado da IHQ

Ao considerarmos a divisão histológica e a positividade à imuno-histoquímica, dentre as amostras classificadas como um, temos 17(62,96%) de positividade à IHQ. Dentre as 25 amostras classificadas como dois, 16(64%) são positivas. Dentre as 23 amostras classificadas como três, 19(82,60%) são positivas. (GRÁFICO 15).

Não foi observada associação ou correlação entre a imuno-histoquímica e a necrose ou forma clínica ou quadro histopatológico.

GRÁFICO 15: Distribuição da positividade e negatividade da imuno-histoquímica entre amostras com classificação histológica um, dois e três



Correlação entre a classificação histológica em três grupos e o resultado da IHQ:

Grupo um com infiltrado inflamatório com plasmohistiocitário na ausência de células gigantes e áreas de necrose; Grupo dois com infiltrado granulomatoso desorganizado com células gigantes sem no entanto, formar granulomas coesos; Grupo três com presença de granulomas tuberculóides, com áreas de necrose áreas de necrose

Quanto levamos em consideração a frequência de positividade e negatividade da imuno-histoquímica entre amostras e o subgênero da *Leishmania* observamos que dentre as 62 amostras de *Leishmania Viannia*, 41(66,13%) são positivas à imuno-histoquímica. Dentre as 13 amostras identificadas com *Leishmania Leishmania*, onze (84,62%) são positivas. (TABELA 5).

Não foi observada associação ou correlação entre a imuno-histoquímica e a espécie do parasito.

TABELA 05 : Correlação entre o subgênero da *Leishmania* e o resultado da imuno-histoquímica

Subgênero da <i>Leishmania</i>	Imuno-histoquímica		Total
	Positiva	Negativa	
<i>Leishmania Viannia sp.</i>	41	21	62
<i>Leishmania Leishmania sp.</i>	11	02	13
Total	52	23	75

Correspondência entre o subgênero da *Leishmania* e o resultado da IHQ nas 75 amostras analisadas

Em geral, após análise histológica (coloração da Hematoxilina-Eosina – HE) em todas as amostras de pele dos pacientes com LTA, independente da forma clínica, foram vistas alterações epiteliais tais como: (1) hiperqueratose caracterizada pela deposição de quatro a cinco camadas de queratina da camada córnea; (2) acantose que se apresenta como o espessamento da epiderme às custas da proliferação da camada espinhosa; (3) aspecto vacuolado das células da camada espinhosa (degeneração hidrópica). (FIGURA 2 A-C). Na derme foi encontrado, em todos os casos, infiltrado de células mononucleares (inflamação crônica) constituído por linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Macrófagos, por sua vez, apresentavam-se tanto na forma epitelióide ou formando células gigantes do tipo corpo *Langhans* ou do tipo corpo estranho (FIGURA 3 A-C). Em 27 casos o infiltrado inflamatório crônico, localizado na derme, era difuso, com ou sem presença de células epitelióides, áreas de necrose e ausência de células gigantes (classificação 1) (FIGURA 4 A-C). Todavia, em 23 casos o infiltrado apresentou-se organizado caracterizado pela formação dos chamados Granulomas do Tipo Epitelióide (tuberculóide) com ou sem áreas de necrose (classificação 3) (FIGURA 5 A,B). Em alguns casos de infecção por *L. (L.) amazonensis* foram identificados granulomas com aspecto distinto. Esses eram formados preferencialmente por macrófagos vacuolados, também descritos como *Granuloma de Virchow* (FIGURA 5C).

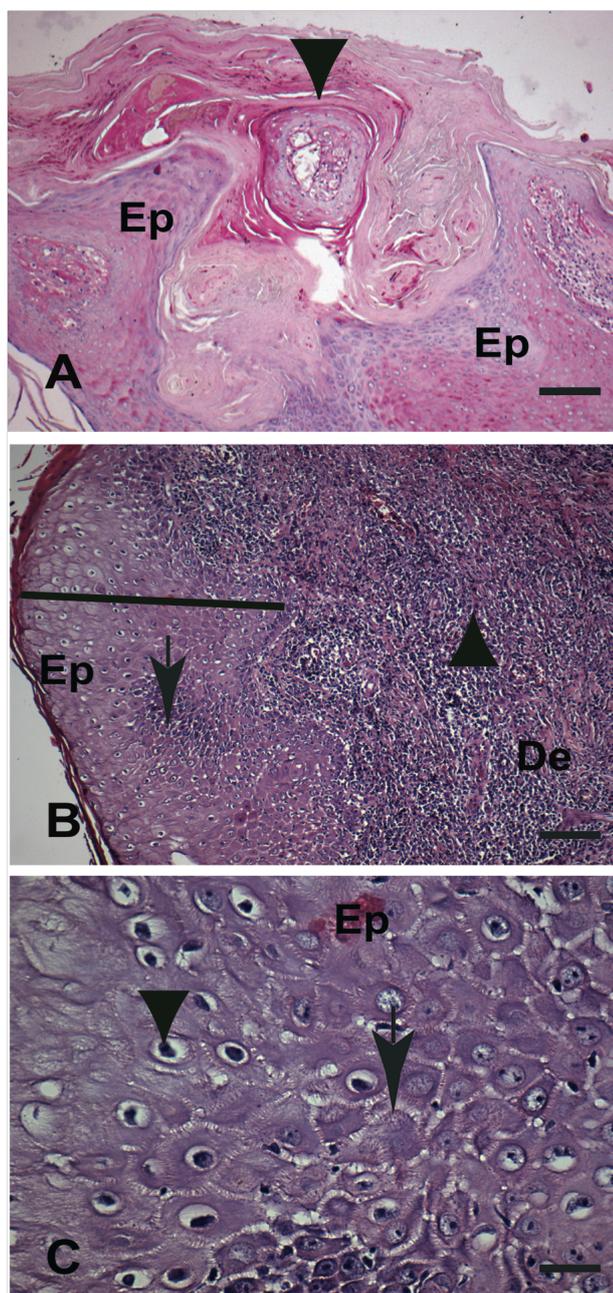


Figura 2A-C: Corte histológico de fragmento de pele de fragmentos de pele de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) com testes parasitológicos positivos para *L. braziliensis*: (A) Observar intensa hiperqueratose (cabeça de seta); (B) notar acantose caracterizada pelo espessamento da epiderme (traço) e inflamação intensa e difusa na derme (triângulo). (C) detalhe da figura anterior demonstrando a degeneração hidrópica na epiderme (cabeça de seta) e edema intercelular (seta preta). Hematoxilina-Eosina (HE) . (Ep) Epiderme; (De) Derme; Barras: (A) = 62 μm , (B) = 32 μm ; (C) = 16 μm .

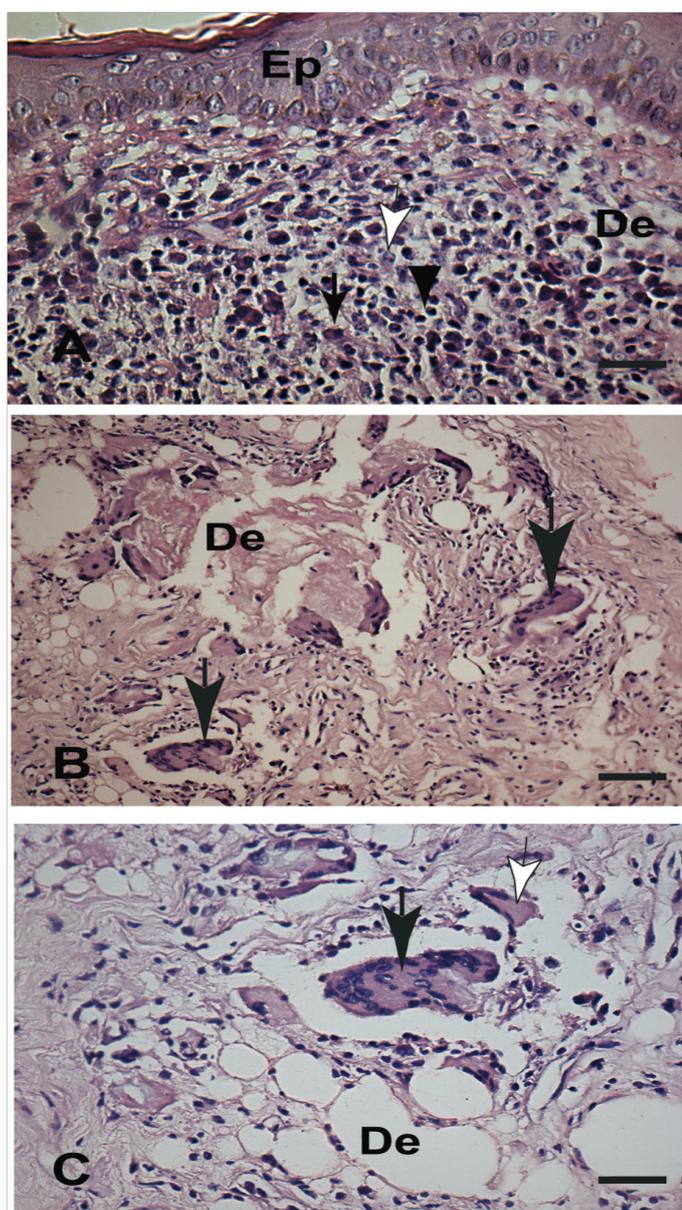


Figura 3A-C: Corte histológico de fragmento de pele de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) com testes parasitológicos positivos para *L. braziliensis*: (A) Na derme observar infiltrado inflamatório de mononucleares constituído por plasmócitos (seta negra), macrófagos (seta branca) e linfócitos (cabeça de seta). (B) Presença de células gigantes (setas grandes), mas sem a formação de granuloma. (C) Ao centro da figura observar célula gigante com seus núcleos desorganizados conferindo o aspecto de célula gigante do tipo corpo estranho (seta negra). Mais acima notar célula gigante com seus núcleos organizados em forma de ferradura denotando a célula gigante do tipo Langhans (seta branca). Hematoxilina-Eosina (HE). (Ep) Epiderme; (De) Derme; Barras (A-C) = 16 μ m.

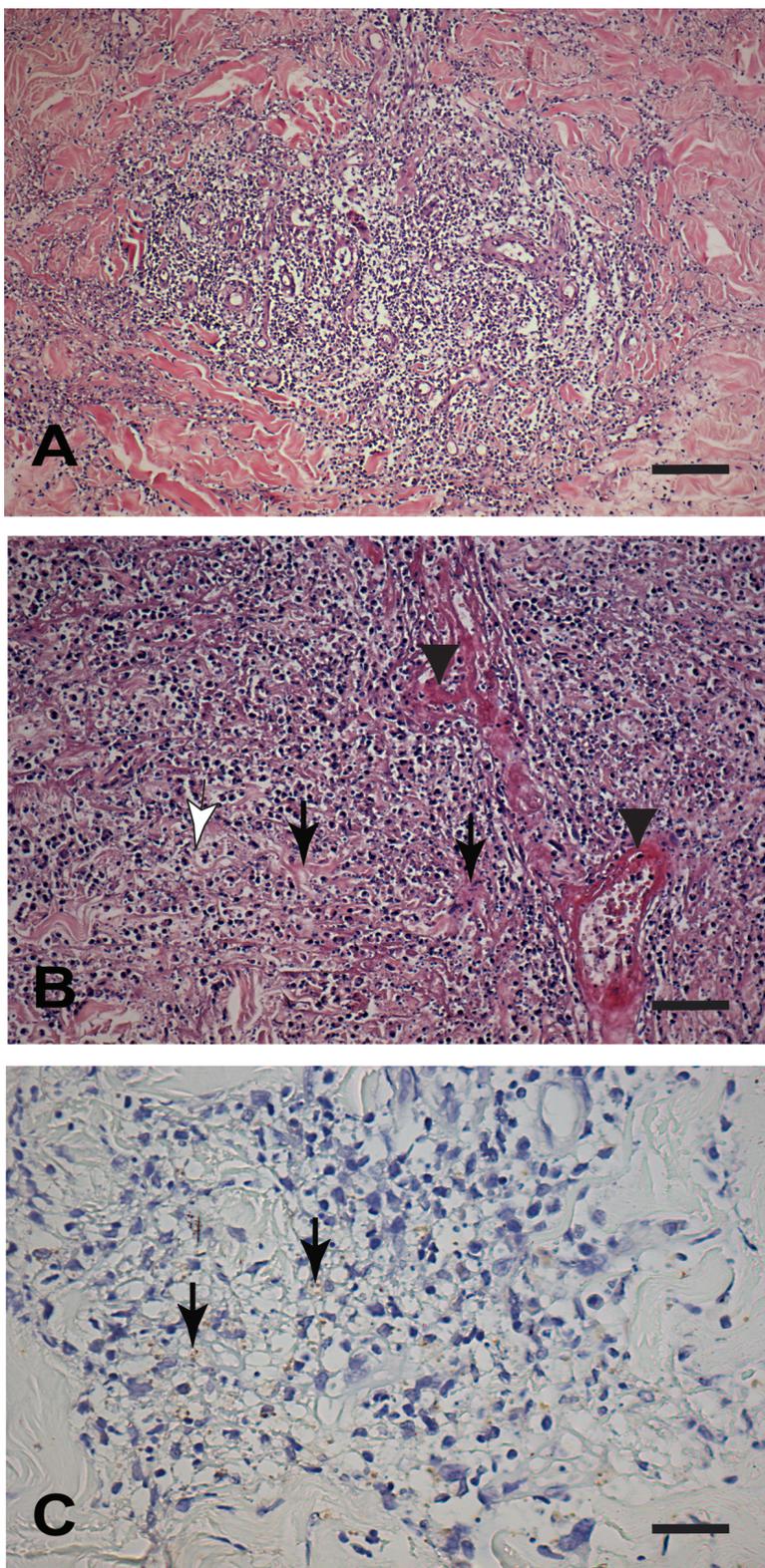


Figura 4A-C: Corte histológico de fragmento de pele de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) com testes parasitológicos positivos para *L. braziliensis*: (A) Ao centro da figura observar infiltrado inflamatório intenso na derme, mas sem a formação de granuloma. Em (B) infiltrado inflamatório de mononucleares associado a necrose das fibras colágenas. Essas mostram-se ora eosinofílicas de aspecto hialino (setas negras) ou esfaceladas (seta branca). Observar vasos sanguíneos com parede eosinofílica caracterizando hialinose (cabeças de setas). (C) Presença de formas amastigotas de *Leishmania* imunomarcadas (marrom) associadas a degradação colagênica (setas negras). (A,B) Hematoxilina-Eosina (H&E); (C) Método imunohistoquímico da peroxidase. Barras (A) = 32 μ m; (B,C) = 16 μ m .

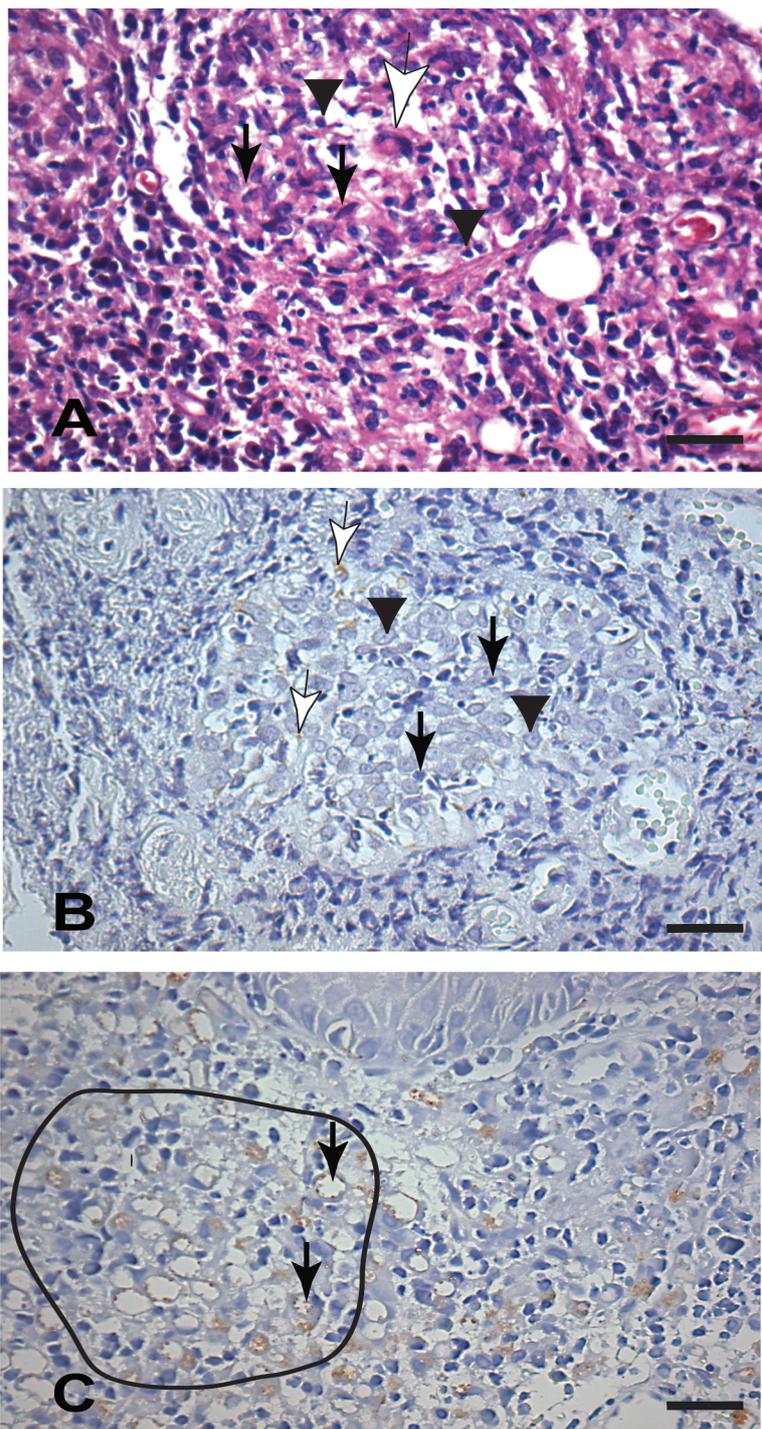


Figura 5 (A,B): Corte histológico de fragmento de pele de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) com testes parasitológicos positivos para *L. braziliensis*. **(C)** Corte histológico de fragmentos de pele de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) com testes parasitológicos positivos para *L. amazonensis*. (A) Ao centro da figura observar a formação de granuloma constituído por uma célula gigante (seta branca); células epitelióides (setas negras) e linfócitos (cabeças de seta); (B) Granuloma constituído basicamente pelos macrófagos de aspecto epitelióides (cabeça de seta) com presença de alguns linfócitos (setas negras) e algumas formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* (setas brancas); (C) Notar agregado de macrófagos intensamente parasitados formando o chamado *Granuloma de Virchow* (linha contínua circunscrita em negro). (A,B) Hematoxilina-Eosina (H&E); (C) Método imuno-histoquímico da peroxidase. Barras (A-C) = 16 µm .

6 DISCUSSÃO

Seguindo o objetivo de validação da técnica de imuno-histoquímica a proposta do trabalho foi simular a situação real do diagnóstico de leishmaniose no Brasil. Na tentativa de obter amostras de lesões de pacientes de diferentes regiões endêmicas do país, foram firmadas algumas parcerias. Porém, a principal limitação que identificamos foi a falta de uniformidade nas informações sobre os pacientes avaliados, elas foram colidas seguindo diferentes tipos de prontuários, o que resultou em ausência de alguns dados para comparação, o que discutiremos mais adiante nesse trabalho.

A LTA com frequência ocasiona desfiguração facial extensa, provocando problemas de ordem social de grande complexidade, debilitando e incapacitando pacientes com conseqüente redução da força de trabalho em determinadas regiões, podendo, assim, criar um ciclo vicioso de pobreza e constituir barreira ao progresso. (DESJEUX, 1996). A situação de pobreza e a dificuldade de acesso ao serviço de saúde, bem como a precariedade do atendimento primário, em especial em áreas afastadas dos grandes centros urbanos, foram observadas em expedição ao norte de Minas Gerais e se repetem ao longo do país, especialmente no interior, de onde provêm a quase totalidade das amostras. A leishmaniose tem ligações fortes e complexas com a pobreza. O ônus recai desproporcionalmente sobre os segmentos mais pobres da população. Nas áreas endêmicas, o risco de infecção aumenta pelas condições precárias de habitação e saneamento. A pobreza está associada a má nutrição e a outras doenças infecciosas, que aumentam o risco de uma pessoa, uma vez infectada, desenvolver a doença clinicamente. A falta de acesso à saúde provoca atraso no diagnóstico e tratamento adequados, e acentua a morbidade e mortalidade. (ALVAR, 2006).

As amostras estudadas são de pacientes atendidos em centros de atenção terciária (Centro de Referência Nacional em Hanseníase/Dermatologia Sanitária, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia; ambulatório do Laboratório de Leishmanioses “Prof. Dr. Ralph Lainson”, do Instituto Evandro Chagas, Pará; ambulatório do Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad, Goiania), com exceção daquelas colhidas no norte de Minas Gerais em expedição organizada pela Professora Célia Gontijo (FIOCRUZ/MG). A procedência dos pacientes, entretanto, está em sua maioria em pequenas cidades do interior. Tal constatação nos remete ao fato de que ausência de recursos diagnósticos e terapêuticos nas pequenas localidades das zonas endêmicas, resulta em fluxo de tratamento fora de domicílio em direção

as grandes cidades onde estão os hospitais terciários, retirando o doente de sua comunidade e gerando custos financeiros e sociais. Outras consequências da desestruturação do atendimento primário são o atraso no diagnóstico, tratamento e percentual de doentes sem atendimento.

A idade variou entre 14 e 75 anos, com média de 38,78 anos, mediana de 34 anos e moda de 34 anos, e foi mais frequente no sexo masculino, 81,4%, o que condiz com a literatura. (CASTRO *et al.*; 2002; MARTINS *et al.*; 2014)

A epidemiologia das leishmanioses no Brasil mudou nos últimos anos. Inicialmente, a LTA foi considerada uma zoonose de animais silvestres, que foi acidentalmente transmitida aos seres humanos quando eles entraram em contato com as florestas para exploração, extração de madeira, construção de estradas ou mineração. A condição era, portanto, uma doença profissional dos indivíduos do sexo masculino. No entanto, mais recentemente, as intensas mudanças ambientais associadas ao desmatamento e desenvolvimento da agricultura também fizeram agricultores vulneráveis à doença. (CASTRO *et al.*, 2002)

Quanto à ocupação dos pacientes podemos notar predominância dos trabalhadores rurais (49,33%), grupo que engloba os que se declararam vaqueiros, lavradores e produtores rurais. O fato de a leishmaniose cutânea e mucosa ser mais frequente entre os habitantes de áreas rurais já foi descrito. (CASTRO *et al.*; 2002; MARTINS *et al.*; 2014). É importante ressaltar, ainda que a ocupação não seja trabalhador rural, muitos dos pacientes que se declararam como estudante, servidor público e do lar, são de fato moradores de áreas rurais e suas atividades diárias incluem, muitas vezes, exposição à picada do vetor.

A forma clínica mais frequente foi a cutânea, 84%, sendo a forma mucosa presente em 14,66% dos casos e em 1 caso ocorreu a forma anérgica difusa. A literatura demonstra o desenvolvimento de lesões mucosas, em média, em 3 a 5% dos casos, tal estimativa reforça a idéia de considerar a FM como secundária a FC, mesmo nos casos em que a lesão de pele não é detectada ou é auto limitada. A proporção da FM foi inversamente correlacionada com a prevalência da infecção. Em áreas com uma prevalência de infecção menor, a proporção de leishmaniose mucosa é maior. Em regiões com menor prevalência e "endemicamente jovens", a proporção de casos que evoluem para a forma mucosa é maior do que nas regiões com maior prevalência e "endemicamente velhas". (PACHECO *et al.*, 2011). É importante ressaltar que foram classificados como sendo de forma mucosa, pacientes cujo local de

biopsia foi a mucosa. É possível que pacientes classificados como de forma cutânea, com mais de uma lesão, em cujos prontuários não constava a localização de todas as lesões, tenham a forma cutâneo mucosa da doença.

A localização corporal mais frequente das lesões foi a perna, seguida de braço. Essas são as localizações mais descritas na literatura e se devem ao fato de que as áreas expostas são as mais facilmente inoculadas. As lesões foram únicas em sua maioria (50,67%), o que também corresponde ao que já foi descrito anteriormente. (CASTRO *et al.*; 2002).

O tempo de evolução variou entre 15 dias e 72 meses, sendo que, dos 63 casos em que o tempo de evolução foi conhecido, em 19 (30,16%) o tempo entre o surgimento da lesão e a biopsia foi igual ou maior que 12 meses. Uma vez tendo sido atendido na atenção primária à saúde, o acesso a exames complementares confirmatórios é usualmente demorado, no entanto, muitos pacientes demoram a procurar o serviço de saúde. Esta demora pode se dever ao medo da doença e à negação da sua condição, podendo ainda ser resultado de pouco conhecimento do processo de adoecimento relacionado aos baixos níveis de escolaridade. No caso da forma cutânea isolada, são frequentes tentativas caseiras de cura com os mais diversos métodos, como pomadas de uso dermatológico, produtos de limpeza e até cauterização com fogo. (ALVAR, 2006; MARTINS *et al.*; 2014).

Visando contrapor o trabalho anterior de Alves *et al.* (2013) quando apenas pacientes com IDRМ positiva foram incluídos, nesse trabalho, além dos pacientes com IDRМ positiva, foram incluídos aqueles sem registro de IDRМ no prontuário ou com IDRМ negativa. Observou-se que a positividade na técnica IHQ proposta é igual, 50% em cada grupo, entre os pacientes cujo resultado da IDRМ não estava disponível (por não ter sido informado ou por não ter sido realizado). Nos pacientes com IDRМ negativa a IHQ foi positiva com maior frequência 85,71%, quando comparada com os pacientes com IDRМ positiva, 74,36%, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,0474$). Uma possível explicação para essa diferença é o fato de que, em pacientes com imunidade celular mais desenvolvida (IDRМ positiva) a eliminação do parasita no tecido é facilitada, isto é, com menor carga parasitária a chance de identificação na imuno-histoquímica seria menor. Antonio *et al.*; (2014) conduziram estudo caso-controle que verificou a associação entre a intradermoreação de Montenegro (IDRМ), o tempo de evolução da lesão e a resposta terapêutica em pacientes com leishmaniose cutânea atendidos no Instituto de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz, Rio de

Janeiro e tratados com antimoniato pentavalente. Estes pesquisadores concluíram que o tratamento precoce, traduzido pelo tempo de evolução da lesão menor que dois meses no primeiro dia de atendimento, e resposta de imunidade celular deficiente, traduzida por IDRMs menos intensa, demonstraram contribuir para a ocorrência de falha terapêutica na leishmaniose cutânea.

Atualmente, mais de 20 espécies de *Leishmania* são conhecidas e primariamente caracterizadas pelo seu tropismo (cutâneo, mucocutâneo e visceral). Noventa por cento das infecções por *Leishmania* são restritas à pele, mas essa limitação depende da resposta imune do hospedeiro. Mesmo espécies que usualmente promovem infecção cutânea, podem promover formas mais graves da doença (crônica recorrente, disseminada, anérgica e visceral). A imunidade protetora contra a *Leishmania* é essencial para a defesa do organismo contra esse importante patógeno. (VON STEBUT, 2007). No estudo em questão a maioria, 88%, dos pacientes, apresentou infecção por *Leishmania*, do complexo *Viannia*, sendo conhecido o fato de que a *Leishmania (V.) braziliensis* ser espécie amplamente distribuída no Brasil, incluindo áreas rurais e peri-urbanas. (MARZOCHI 2011) Alguns estudos relatam *L. (V.) braziliensis* em aproximadamente 55 % dos casos de LTA na região amazônica e em cerca de 95% dos casos fora da Amazônia. Existe, ainda que dentro de região restrita, pleomorfismo de uma mesma espécie. A complexidade do ciclo de transmissão e a coexistência de duas ou mais espécies que vivem em uma mesma área afetam o nível de polimorfismo genético em populações de *Leishmania*. (BRITO *et al.*; 2009). Partindo-se desses fatos, para considerar um método imuno-histoquímico eficiente para uso no diagnóstico de LTA ele deverá se mostrar eficiente nas mais diversas regiões, uma vez que uma mesma espécie pode se apresentar de forma heterogênea.

A LTA tem como característica o parasitismo das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) pelas formas amastigotas de *Leishmania*, responsável pela sintomatologia clínica (SILVEIRA *et al* 2004). Há uma grande variabilidade histológica entre as amostras tegumentares dos diversos pacientes, no entanto um padrão predominante com presença de granuloma desorganizado sem necrose, é muito comum e poderia ser relacionado a espécies e subespécies de *Leishmania*. Contudo, o conhecimento das relações entre diferenças geográficas específicas e a histopatologia da LTA é limitado devido à complexidade espacial e temporal da interação hospedeiro-parasito. Além disso, outro aspecto que complica este assunto é o fato de os padrões histopatológicos poderem ser diferentes dentro de uma mesma

lesão, dependendo da sua duração. (SILVEIRA, 2004). Nesse trabalho, não houve correlação entre a classificação histológica e a positividade na imuno-histoquímica. As classificações histopatológicas, em que havia formação de granulomas, foram mais comuns nos pacientes infectados pela *L. (L.) amazonensis*, com infiltrado denso de macrófagos vacuolados na derme repletos de amastigotas, o que dá ao infiltrado a aparência de um “granuloma macrofágico” (MORAIS E SILVEIRA, 1994). Isso difere da histopatologia em casos de FC causadas por *L. (V.) braziliensis* e outras espécies do subgênero *Viannia*, em que os macrófagos e as amastigotas são geralmente escassos. Em contraste, os linfócitos, macrófagos e plasmócitos são mais frequentes no infiltrado, que tem as características de um granuloma epitelióide.

Em todas as formas da doença, as amastigotas proliferam em histiócitos do hospedeiro, cuja resposta imunológica é inversamente proporcional a quantidade de parasitas. A presença de grande número de amastigotas parece estar sempre relacionada a uma falha da resposta imunecelular (“resposta anérgica”), caracterizada por muitos macrófagos vacuolados contendo as "lacunas Montenegro", vacúolos esses cheios de parasitas, e poucos linfócitos de permeio. Segundo Martins et al. (2014), um número moderado de parasitas é geralmente associado a necrose e ulceração local, sendo um importante método para eliminar a infecção. No presente estudo, a presença de necrose foi avaliada, mas não foi encontrada relação com a positividade na imuno-histoquímica ou com outra variável.

Em trabalho utilizando como anticorpo secundário soro policlonal de coelho anti-*Leishmania (L.) chagasi*, QUINELLA et al. (2009), demonstraram que a reação de imuno-histoquímica é um método diagnóstico parasitológico útil e sensível para a detecção de formas amastigotas de tecidos em lesões de leishmaniose cutânea ativa quando utilizadas em amostras rotineiramente processadas, e pode contribuir significativamente para o diagnóstico parasitológico da LTA. 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). Segundo o Manual de Vigilância Epidemiológica de Leishmaniose Tegumentar Americana (BRASIL, 2007) a demonstração direta do parasito (imprint ou esfregaço de aposição) é o procedimento de primeira escolha por ser mais rápido, de menor custo e de fácil execução. No entanto, a metodologia do exame exige profissional experiente para coloração e principalmente leitura (GONTIJO *et al.*, 2003), além de médico treinado para obtenção de material, o que não é a realidade das áreas endêmicas. Uma vez que foi realizada coleta de fragmento de pele através de biopsia (punch ou cunha), esse material é melhor aproveitado em estudo histológico ou imuno-histoquímico que apresentam maiores possibilidades diagnósticas. Nas amostras recebidas dos serviços de referência a informação sobre o exame direto foi irregular, estando ausente em muitos casos, e nas amostras coletas no norte de Minas Gerais, ocorreram dificuldades de fixação do material nas lâminas tendo sido optado por excluir esses dados da análise.

O objetivo principal do presente estudo foi validar um método de imuno-histoquímica já padronizado previamente por Alves *et al.*, (2013) para o diagnóstico parasitológico de certeza da LTA. Dessa maneira houve a opção por uma amostra em que todos os pacientes fossem positivos para a doença. O teste escolhido como padrão ouro foi a PCR, cuja positividade foi condição para inclusão da amostra. O motivo da escolha da mesma foi o fato de ser este o método diagnóstico mais sensível para LTA. (FABER, 2003). Em trabalho anterior Alves *et al.* (2013) usaram como critério de inclusão a positividade na IDR e no esfregaço de aposição (imprint), métodos com sensibilidade variável mas reconhecidamente menor que a reação PCR. (MELLO *et al.*; 2011). Essa diferença de critérios de inclusão acarreta uma maior possibilidade de positividade no trabalho de Alves (2013) quando comparado com o trabalho atual, uma vez que, quando se tem um teste parasitológico previo com identificação de amastigotas a probabilidade de se identificar amastigotas novamente com a IHQ é maior. Por outro lado, a positividade da reação de PCR está relacionada a presença do material genético do parasita no tecido o que não necessariamente é evidenciado na imuno-histoquímica.

A ausência de outros testes diagnósticos (cultura, esfregaço de aposição) e a não inclusão de casos com reação de PCR negativo limitou o cálculo de sensibilidade e especificidade no método nesta amostra. O que, no entanto, não compromete a validação da técnica proposta por Alves *at al* (2013) que demonstrou ser eficiente na detecção de formas amastigotas de *Leishmania* na pele e mucosa de pacientes com lesões de LTA.

A disponibilização de diagnóstico etiológico sensível e acessível às áreas endêmicas é necessária para otimizar o tratamento da doença, uma vez que o tratamento da leishmaniose cutânea acelera a cura, reduz cicatrizes e recorrências, e pode reduzir a frequência de disseminação da doença para as mucosas das vias aéreas superiores. O antimônio pentavalente parenteral ainda é o tratamento de primeira escolha em muitos países, inclusive no Brasil (BRASIL, 2007; TOLEDO JUNIOR *at al*, 2014). No entanto, a injeção intramuscular ou intravenosa diária durante 20 dias, causa desconforto ao paciente e é difícil de administrar em regiões que carecem de recursos. Além disso, o antimônio pentavalente é fármaco tóxico e pode causar efeitos adversos graves e potencialmente fatais, tais como pancreatite aguda e arritmias cardíacas. Frequentemente, os pacientes têm contra-indicações formais ao uso do antimônio, como diabetes mellitus não controlada, doença hepática, cardíaca e doença renal crônica. Estas condições são mais comuns em pacientes idosos, depois de alguns dias de administração da medicação e em casos em que são necessárias doses mais elevadas. Outras opções de tratamento incluem a pentamidina e anfotericina B, que são ambos injectáveis e têm perfil de segurança semelhante ao antimônio. As formulações lipídicas de anfotericina B têm perfil mais favorável de segurança, porém são caras e de difícil acesso. Vários estudos avaliaram medicamentos orais como candidatos para o tratamento da LTA, como miltefosine, fluconazol e azitromicina, com resultados controversos ou nenhuma evidência clara da eficácia. (TOLEDO JUNIOR *at al*, 2014).

6 CONCLUSÃO

A LTA é doença em expansão, mais prevalente em áreas rurais e afastadas dos grandes centros urbanos, que possui elevada morbidade. Apresenta dificuldades no que se refere a técnicas diagnósticas acessíveis à população que habita as áreas endêmicas. No trabalho atual testamos a técnica de imuno-histoquímica, foi utilizado, como anticorpo primário, o soro de cão naturalmente infectado com *L. infantum chagasi*, em pacientes de oito estados brasileiros, com 69,3% de sensibilidade. A técnica apresentada tem a vantagem de ter possibilitado o diagnóstico em casos de evolução arrastada ou recente, em pacientes com IDRMs positiva ou negativa, em formas clínicas cutâneas, mucosas e anérgica difusa, e em pacientes com apresentação histológica com ou sem formação de granuloma e com ou sem necrose. Existe, ainda, a vantagem do baixo custo do processo e da maior simplicidade de execução quando comparada à reação de PCR, fazendo com que haja maior possibilidade de utilização em centros de atenção secundária. Desta forma a técnica em estudo poderá ajudar na decisão terapêutica acertada uma vez que a leishmaniose é doença cujo tratamento possui efeitos colaterais importantes. Proponho que façamos uma divulgação da técnica junto às Secretarias Estaduais de Saúde para que ela possa ser adicionada aos exames diagnósticos já realizados, especialmente em série com o exame anatomopatológico, aumentando assim a probabilidade de detecção do parasita.

7 REFERÊNCIAS

ANTONIO, Liliane de Fátima et al . MONTENEGRO SKIN TEST AND AGE OF SKIN LESION AS PREDICTORS OF TREATMENT FAILURE IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo , v. 56, n. 5, Sept. 2014

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology* v. 22, n. 12 p 552-557

ALVAR J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, et al. (2012) Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7(5): e35671. doi:10.1371/ journal.pone.0035671

ALVES CF, Figueiredo MM, Souza CC, Machado-Coelho GLL, et al. American Tegumentary Leishmaniasis: Effectiveness of an Immunohistochemical Protocol for the Detection of *Leishmania* in Skin. *PLoS ONE* 8(5): e63343. doi:10.1371/journal.pone.0063343 (2013)

AVILES, H. BELLI, A., ARMIJOS, R., MONROY, F. P., HARRIS, E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol* 85: 181-187. 1999

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

BRITO ME, ANDRADE MS, MENDONÇA MG, SILVA CJ, ALMEIDA EL, LIMA BS, FÉLIX SM, ABATH FG, DA GRAÇA GC, PORROZZI R, ISHIKAWA EA, SHAW JJ, CUPOLLIO E, BRANDAO- FILHO SP. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Trop Med Int Health* 14: 1278–1286. 2009

CASTRO, Edilene Alcântara de et al Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba , v. 35, n. 5, Oct. 2002.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin. Dermatol.*, v.14, p.417-23, 1996

DOWLATI, Y. Cutaneous leishmaniasis: Clinical aspect *Clin Dermatol*, 4, pp. 425–431, 1996

FABER, W.R.; OSKAM, L.; VAN GOOL, T. *et al.* - Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J. Amer. Acad. Derm.*, 49: 70-74, 2003.

GOTO H, LINDOSO JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis *Expert Rev Anti Infect Ther.* Apr;8(4):419-33. 2010

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.

GRAÇA, G.C.; VOLPINI, A.C.; ROMERO, G.A.S.; NETO, M.P.O.; HUEB, M.; PORROZZI, R.; BOITÉ, M.C.; CUPOLILLO, C. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107(5): 664-674, 2012

GROCOTT RG. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori' s methenamine silver nitrate technic. *Am J Clin Pathol* 25:975-979,1955.

KRASNOW, I. & WAUNE L.G. Comparision of methods for tuberculosis bacteriology. *Apl. microbiology* 18:915-917, 1969.

KUBBA, R., AL-GINDAN, Y., EL-HASSAN A.M. et al. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis *J Am Acad Dermatol*, 16 , pp. 1183–1189 .1987

LAINSON R. The American leishmaniasis: some observa- tions on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 569-596. 1983

LAINSON R, SHAW JJ New World Leishmaniasis – The Neotropica Leishmania Species. In FEG Cox, JP Kreier, D Wakelin (eds), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th ed., Vol. 5, Parasitology, Arnold, Lon- don, p. 242-266. 1998.

LUNEDO, SN; SOCCOL, VT; CASTRO, EA; QUEIROZ TELLES, JE. Imunocitoquímica e Imunohistoquímica para o Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Tegumentar. *RBAC* v.43 (2): 131-134, 2011

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*.. *Rev Inst Med Trop*, v.28, n.6, p.421-430, 1986b.

MARTINS, A.L.G.P. et al, . American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro , v. 89, n. 1, Feb. 2014.

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.

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

MELLO, C.X.; SCHUBACH, A.O.; OLIVEIRA, R.V.C.; SILVA, F.C.; PIMENTEL, MIF; LYRA, M.R.; VASCONCELLOS, E.C.F.; MADEIRA, M.F.; Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol Res* (2011) 109:927-933 2011

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.

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.

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

PACHECO, S. J. B. ; MELO, M. H. A. ; PIMENTEL, M. I. F. ; ROSALINO, C. M. V. ; CONCEIÇÃO SILVA, F. ; SCHUBACH, Armando de Oliveira ; MARZOCHI, M. C. A. . Endemic Tegumentary Leishmaniasis in Brazil: Correlation between Level of Endemicity and Number of Cases of Mucosal Disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 84, p. 901-905, 2011.

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

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.

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.

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.

SALMAN, S.; RUBEIZ, N.G.; KIBBI, A.G. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. *Clin Dermatol*, v.17, p.291-296, 1999.

SILVEIRA FT, DUARTE ERL, DE FARIAS ECF, IKEDA CS, LOPES AP, CHAGAS, EJP, TEIXEIRA LM, ISHKAWA EA. Leishmaniose mucosa na Amazônia brasileira: Avaliação, retrospectiva, dos aspectos clínicos e epidemiológicos da doença, com ênfase ao estado do Pará. *Rev Soc Bras Med Trop* 32 (Supl. I): 9. 1999

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and Immunopathological

Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.99, n.3, p.239-251, 2004.

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.

TOLEDO JUNIOR, Antonio et al. Poor response to azithromycin in cutaneous leishmaniasis leading to a premature interruption of a multicentric phase III clinical trial in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 47, n. 6, Dec. 2014

VAN DER MEIDE W; SCHOONE G., FABER W., ZEEGELAAR J., DE VRIES H., ÖZBEL Y., LAI A., FAT R., LEILA I., COELHO L., KASSI M., SCHALLIG H. 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.* 2005;43(11):5560–5566

VON STEBUT, E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol* Mar-Apr;17(2):115-22. Epub 2007

WEIGLE K., SARAIVIA, N.G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis *Clin Dermatol*, 14 (1996), pp. 433–450

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em: <http://www.who.int/Leishmaniasis/en_>. Acesso em 20 de Setembro de 2014

ANEXO 1

Tabela: Distribuição das características demográficas da amostra

TABELA: Distribuição das características demográficas da amostra

Procedência	Idade	Sexo	Ocupação
Crixás (GO)	40	M	Trabalhador rural
Jaborandi (BA)	15	F	Trabalhador urbano
Pium (TO)	42	M	Trabalhador urbano
Ronom (PA)	33	M	Trabalhador rural
Guaraí (TO)	31	M	Trabalhador rural
Aparecida de Goiania (GO)	27	M	--
Niquelandia (GO)	31	F	Trabalhador urbano
Baliza (GO)	25	M	Trabalhador urbano
Novo Brasil (GO)	45	M	Trabalhador urbano
Sorriso (MT)	25	M	Trabalhador rural
Conceição do Araguaia (PA)	34	M	Trabalhador urbano
- (PA)	47	M	Trabalhador rural
Barra do Corda (MA)	60	M	Trabalhador rural
Xinguara (PA)	--	M	Trabalhador rural
Jussara (GO)	--	M	Trabalhador urbano
Nova Crixás (GO)	57	M	Trabalhador rural
Palmerópolis (TO)	50	F	Trabalhador rural
Campinópolis (MT)	20	M	--
Pontal (MT)	41	M	Trabalhador rural
Unai (MG)	31	M	Trabalhador rural
Capitão do Poço (PA)	33	M	Trabalhador rural
Eldorado de Carajás (PA)	39	M	Trabalhador rural
Bom Jesus (MT)	36	M	Trabalhador urbano
Matrincha (GO)	53	M	--
Barra das Graças (MT)	34	M	Trabalhador rural
Araguaina (TO)	--	M	Trabalhador rural
Taguatinga (TO)	22	M	Trabalhador rural
--	22	M	--
--	52	M	--
Minacu (GO)	62	M	Trabalhador rural
Parauapebas (PA)	54	M	Trabalhador rural
- (GO)	47	F	Trabalhador urbano
Colinas (TO)	33	M	Trabalhador rural
Aparecida de Goiania (GO)	27	F	Do lar
Porangatu (GO)	26	M	Trabalhador rural
Araguacema (TO)	19	M	Trabalhador urbano
Santa Barbara (GO)	20	M	Trabalhador rural
General Carneiro (MT)	31	M	Trabalhador rural
Minas Novas (MG)	51	M	Trabalhador rural
Rurópolis (PA)	33	M	Trabalhador rural
Manaus (AM)	21	M	Trabalhador rural
Bom Jesus (MT)	51	F	Trabalhador urbano
Januária (MG)	31	M	Trabalhador urbano
Januária (MG)	37	M	Trabalhador rural
Januária (MG)	65	M	Trabalhador rural
Januária (MG)	17	F	Estudante
Januária (MG)	59	F	Do lar
Januária (MG)	14	M	Estudante

Januária (MG)	75	F	Do lar
Januária (MG)	46	M	Trabalhador rural
Januária (MG)	70	F	Do lar
Januária (MG)	45	M	Trabalhador rural
Januária (MG)	19	M	Trabalhador rural
São João das Missões (MG)	27	F	Trabalhador rural
São João das Missões (MG)	47	F	Do lar
São João das Missões (MG)	34	M	Servidor Público
São João das Missões (MG)	70	M	Trabalhador rural
Mojú (PA)	35	M	Trabalhador rural
Oieras do Pará (PA)	34	M	Trabalhador rural
Bonito (PA)	49	M	Trabalhador rural
Maracanã (PA)	19	M	Trabalhador rural
Ipixuna (PA)	34	M	Servidor Público
Viseu (PA)	41	M	Trabalhador rural
Augusto Correia (PA)	22	F	Estudante
Igarapé Açu (PA)	38	M	Trabalhador rural
Paragominas (PA)	54	M	Servidor Público
--	--	M	--
--	34	M	--
--	57	M	--
--	33	M	--
--	52	M	--
--	34	M	--
--	34	M	--
--	50	M	--
--	58	F	--

Procedência das amostras (município e estado), em dois casos apenas informação do estado estava disponível e em onze amostras esta informação não estava disponível.

Idade em anos, não disponível em quatro casos.

Distribuição quanto ao gênero masculino ou feminino.

Classificação da ocupação em trabalhador rural, trabalhador urbano, estudante, do lar e servidor público, informação não disponível em 12 amostras.

ANEXO 2

Tabela: Características clínicas das lesões

TABELA – Características clínicas das lesões

Forma Clínica	Número de lesões	Localização das lesões (biopsiadas)	Tempo de evolução (meses)
FM	1	Mucosa nasal	24
FC	2	Orelha/ Braço	12
FC	1	Orelha	4
FC	1	Mão	3
FC	1	Perna	1
FC	1	Braço	12
FC	1	Perna	12
FC	35	Perna	3
FC	1	Perna	3
FC	1	Orelha	12
FC	1	Perna	2
FM	1	Mucosa nasal	72
FC	3	Braço	12
FM	1	Mucosa nasal	48
FC	8	Braço	1,5
FC	14	Braço	2
FM	1	Mucosa nasal	24
FC	1	Perna	2
FC	1	Perna	3
FC	2	Braço	3
FC	1	Face	2
FM	1	Mucosa nasal	24
FC	1	Braço	4
FM	2	Mucosa nasal	24
FM	1	Mucosa nasal	6
FC	2	Braço	6
FC	4	Braço	6
FC	--	Mão	--
FC	--	Perna	--
FC	2	Braço/Face	12
FC	--	Perna	3
FM	--	Mucosa nasal	--
FC	3	Perna	6
FC	1	Perna	1
FM	1	Mucosa nasal	--
FC	1	Perna	1
FC	1	Couro cabeludo	72
FM	--	Mucosa nasal	72
FM	--	Mucosa nasal	2
FC	5	Perna	0,5
FC	1	Braço	2
FC	20	Face/tronco/ Membros	6
FC	1	Braço	3
FC	2	Tronco	2
FC	3	Face	5
FC	40	Perna	4

FC	2	Perna	10
FC	3	Perna/Tronco	1,5
FC	1	Perna	4
FC	6	Perna	6
FC	1	Perna	4
FC	6	Braço/ Tronco	3
FC	1	Perna	3
FC	1	Perna	12
FC	3	Braços /Tronco	4
FC	3	Perna	4
FC	2	Braço/ Perna	12
FC	2	Tronco	1
FC	1	Perna	60
FC	3	Perna	60
FC	1	Braço	4
FC	2	Face	3
FC	4	Perna	4
FC	1	Braço	3
FAD	Difusa	Difusa	15
FC	1	Perna	8
FC	1	Braço	3
FC	--	Orelha	2
FC	1	Perna	--
FC	1	Face	--
FC	1	Perna	3
FC	1	Perna	--
FC	--	Braço	--
FC	--	Braço	--
FC	1	Perna	3

FC: Forma cutânea; FM: Forma mucosa; FAD: Forma anérgica difusa

Número de lesões por paciente variou de um a 40, em nove casos não foi informado e em um caso ocorreu a forma difusa.

Localização das lesões biopsiadas

Tempo de evolução das lesões em meses, em nove casos a informação não está disponível.

ANEXO 3**Tabela:** Análise laboratorial das amostras

TABELA: Análise laboratorial das amostras

Intradermorreação de Montenegro	Classificação Histológica	Necrose	Imuno-histoquímica	Subgênero ou espécie
positiva	2	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	2	ausente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	1	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	2	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
--	3	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	3	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	1	ausente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	3	presente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	1	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	3	presente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
--	2	ausente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
negativa	1	ausente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
--	1	ausente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	3	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	2	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
--	3	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
negativa	3	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	3	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	3	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	3	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	2	ausente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	1	ausente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	2	ausente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	1	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	3	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	2	ausente	negativa	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
positiva	3	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
--	3	presente	positiva	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
--	1	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	2	presente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	2	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
negativa	2	presente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
--	2	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	1	ausente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
--	2	ausente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
--	1	ausente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
negativo	1	presente	positivo	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
negativo	1	presente	negativo	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	3	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
--	1	presente	negativo	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	1	ausente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	2	ausente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
negativa	1	ausente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>
positiva	1	ausente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp.</i>

negativa	1	ausente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp</i>
positiva	2	ausente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp</i>
negativa	1	ausente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp</i>
positiva	2	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp</i>
--	3	ausente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp</i>
positiva	3	presente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp</i>
--	1	ausente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp</i>
positiva	2	ausente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp</i>
positiva	2	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp</i>
positiva	1	ausente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp</i>
--	3	presente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp</i>
--	2	presente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp</i>
--	3	ausente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp</i>
positiva	1	ausente	positiva	<i>Leishmania (V.) shawi</i>
positiva	1	ausente	positiva	<i>Leishmania (V.) shawi</i>
positiva	3	ausente	positiva	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
negativa	1	presente	positiva	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
negativa	2	ausente	positiva	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
negativa	2	ausente	positiva	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
negativa	2	presente	positiva	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
negativa	2	ausente	positiva	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
positiva	1	presente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp</i>
negativa	3	presente	positiva	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
--	3	presente	positiva	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
--	3	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp</i>
--	2	presente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp</i>
--	1	presente	negativa	<i>Leishmania (V.) sp</i>
positiva	1	presente	positiva	<i>Leishmania (V.) sp</i>
--	3	presente	positiva	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
--	2	presente	negativa	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
--	1	presente	positiva	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>

Resultados dos exames diagnósticos realizados na amostra: Intradermoreação de Montenegro: positiva (39), negativa(14) e não realizada (22) Classificação histológica em grupos um, dois e três
 Presença ou ausência de necrose; Imuno-histoquímica positiva ou negativa Identificação da *Leishmania* em subgênero *Viannia*, espécie *Leishmania (V.) shawi* ou *Leishmania (L.) amazonensis*

ANEXO 4:

Aprovação em comitês de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 187/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Padronização de um método imuno-histoquímico alternativo para o diagnóstico da Leishmania Tegumentar Americana em humanos**", que tem como responsável(is) **Wagner Luiz Tafuri**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/11/2011**.

Este certificado expira-se em **9/11/2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 187/2011**, related to the project entitled "**An alternative imuno-histochemical method for diagnosis of American Tegumentar Leishmaniasis**", under the supervisors of **Wagner Luiz Tafuri**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **November 9, 2011**.

This certificate expires in **November 9, 2016**.

Belo Horizonte, 11 de Novembro de 2011.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br



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 imunoistoquímico 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 5:

Cópia da ata de defesa

Folha de aprovação