

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SANDRO NELSON LUNEDO

**IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O DIAGNÓSTICO
LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

**CURITIBA
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SANDRO NELSON LUNEDO

**IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O DIAGNÓSTICO
LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, área de concentração Saúde Animal e Humana, Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanete Thomaz Soccol

Co-orientador: Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles

**CURITIBA
2007**

Aos meus pais, Nelson Lunedo (*in memoriam*) e Rosinha Ilza Lunedo, pelo amor e dedicação e por me ensinarem o valor do trabalho e do estudo.

À minha esposa, Sandra, pela compreensão, apoio, amizade e amor.

Às minhas filhas, Olívia e Alice, por terem sido companheiras e amorosas e por entenderem minha ausência em alguns momentos.

Aos meus irmãos André, Luciane e Ângela pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Vanete Thomaz Soccol, pela orientação repleta de ensinamentos, compreensão, dedicação e apoio na realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. José Ederaldo Queiroz Telles, pela co-orientação e apoio prestado pelo Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

À Professora Dra. Edilene Alcântara de Castro, pelo apoio e colaboração em várias etapas deste trabalho.

Ao Professor M.Sc. Nei Ferreira de Camargo Neto, pela amizade e ensinamentos na área de imunologia.

À farmacêutica M. Sc. Juliana Tracz, pela amizade e auxílio no laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia Molecular, pelos bons momentos, amizade e ensinamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, pela formação técnica e profissional proporcionada.

Ao Exército Brasileiro, pela oportunidade de crescimento profissional e intelectual na realização deste trabalho.

A todos aqueles que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O aumento significativo no número de casos notificados da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a expansão geográfica da endemia têm motivado o desenvolvimento de novas tecnologias para auxiliar no diagnóstico das leishmanioses, visando minimizar as restrições apresentadas pelos testes diagnósticos disponíveis nos serviços de saúde. O presente trabalho empregou imunocitoquímica e imunohistoquímica (ICQ/IHQ) como métodos diagnósticos laboratoriais para LTA. Amostras de culturas de *Leishmania in vitro* e cortes histológicos de lesões em animais infectados experimentalmente foram submetidos à ICQ/IHQ, utilizando anticorpos policlonais desenvolvidos para este estudo e o complexo avidina-biotina modificado (Ultra Streptavidin®). Foram avaliados o processo de fixação das amostras além da especificidade, estabilidade e imunorreatividade dos anticorpos policlonais. Lâminas de vidro comum, secagem ao ar por 10 minutos e fixação em etanol (95%) apresentaram resultados adequados para ICQ. Em preparações contendo microrganismos comumente encontrados nas lesões de portadores de LTA, a especificidade da metodologia foi de 100%. Os anticorpos policlonais congelados (-20°C) mantiveram-se estáveis por 10 meses. Os anticorpos policlonais purificados por cromatografia (Sephadex®) e obtidos a partir de antígenos insolúveis de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* apresentaram maior imunorreatividade e melhores resultados nas preparações ICQ/IHQ. Em comparação com outras técnicas empregadas para o diagnóstico da LTA, nos casos avaliados, a IHQ apresentou resultados semelhantes aos da histopatologia com coloração HE, com sensibilidade de 33,3% para formas amastigotas. Quando considerada a presença de antígenos de *Leishmania* no padrão celular, a IHQ apresentou uma sensibilidade de 83,3%, sendo significativamente maior que na relativa à histopatologia e compatível com métodos padrão ouro de cultura e PCR. As metodologias de ICQ/IHQ desenvolvidas neste trabalho foram capazes de demonstrar em amostras de culturas *in vivo* e *in vitro* e em biópsias de lesões, a presença de formas promastigotas, amastigotas e antígenos de *Leishmania*, oferecendo contribuição adicional ao diagnóstico da LTA, sendo de fácil aplicação e podendo ser utilizada no sistema público de saúde.

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Diagnóstico laboratorial. Imunocitoquímica e imunohistoquímica (ICQ/IHQ). Anticorpos policlonais.

ABSTRACT

The significant increase in American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) notified cases and the geographic expansion of this endemy has motivated the development of new techniques to help in leishmaniasis diagnosis, seeking the minimization of the restrictions imposed by the diagnostic tests available at the health services. The current study applied immunocytochemistry and immunohistochemistry methods (ICC/IHC) for laboratory diagnosis of ATL. *In vitro* culture and histological sections from tissue experimentally infected were submitted to ICC/IHC using polyclonal antibodies developed for this study and a modified avidin-biotin complex (Ultra Streptavidin®). The specimens fixing protocol and the polyclonal antibodies specificity, estability and immunostaining were evaluated. Ordinary slides, air drying for 10 minutes and ethanol (95%) fixing achieved good ICC staining. The specificity was 100 % in specimens infected with organisms frequently found in ATL lesions. Frozen at -20° C antibodies immunoreactivity was stable for 10 months. The polyclonal antibodies purified by chromatography (Sephadex®) and obtained from *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* insoluble antigens presented most immunostaining and best results in ICC/IHC. Compared with other useful techniques for the ATL diagnosis, at the cases evaluated, IHC showed the same results as hematoxylin and eosin stained (33,3%) for amastigotes recognition. When the presence of *Leishmania* antigens was evaluated at the cellular pattern, IHC presented 83,3% sensitivity, higher than histopathology and consistent with gold standard methods (culture and PCR). The ICC/IHC techniques developed in the current study were able to recognize promastigotes and amastigotes forms and also *Leishmania* antigens in sample culture (*in vivo* and *in vitro*) and in lesion biopsies, offering an additional help to ATL diagnosis once it can be easily applied at the health public system.

Key words: American Tegumentary Leishmaniasis (ATL). Laboratorial diagnosis. Immunocytochemistry and immunohistochemistry (ICC/IHC). Polyclonal antibodies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>Leishmania sp.</i>	25
FIGURA 2 - FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania sp.</i>	25
FIGURA 3 - CICLO BIOLÓGICO DE <i>Leishmania sp.</i>	28
FIGURA 4 - LESÃO EM PATA POSTERIOR DE CAMUNDONGO BALB-C APÓS 21 DIAS DE INOCULAÇÃO DE <i>L. (L.) amazonensis</i>	54
FIGURA 5 - LESÃO EM PATA POSTERIOR DE CAMUNDONGO BALB-C APÓS 21 DIAS DE INOCULAÇÃO DE <i>L. (L.) amazonensis</i>	54
FIGURA 6 - LESÃO EM PATA POSTERIOR DE HAMSTER APÓS 60 DIAS DE INOCULAÇÃO DE <i>L. (V.) braziliensis</i>	55
FIGURA 7 - CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM ANIMAIS IMUNIZADOS COM ANTÍGENOS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS DE <i>Leishmania</i> - SORO (DILUIÇÃO 1/100).....	63
FIGURA 8 - CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM ANIMAIS IMUNIZADOS COM ANTÍGENOS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS DE <i>Leishmania</i> - SORO (DILUIÇÃO 1/200).....	64
FIGURA 9 - INFECÇÃO EXPERIMENTAL (HAMSTER) COM <i>L. (V.) braziliensis</i> , APÓS 60 DIAS DE INOCULAÇÃO. FORMAS AMASTIGOTAS CORADAS POR MAY-GRÜNWARD – GIEMSA PARA AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE SECAGEM, FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO. AUMENTO DE 400X.	70
FIGURA 10 - CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>L. (L.) amazonensis</i> . FORMAS PROMASTIGOTAS CORADAS POR MAY-GRÜNWARD – GIEMSA PARA AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE SECAGEM, FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO. AUMENTO 1000X.	71
FIGURA 11 - INFECÇÃO EXPERIMENTAL (HAMSTER) COM <i>L. (V.) braziliensis</i> , APÓS 60 DIAS DE INOCULAÇÃO. FORMAS AMASTIGOTAS CORADAS POR HEMATÓXILINA-EOSINA PARA AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE SECAGEM, FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO. AUMENTO DE 1000X..	71
FIGURA 12 - COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DOS RESULTADOS DA REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA DE IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO NA DILUIÇÃO 1/100, FRENTE A AMOSTRAS DE CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>L. (V.) braziliensis</i>	74
FIGURA 13 - PROMASTIGOTAS DE <i>L. (V.) braziliensis</i> OBTIDAS DE CULTURA <i>IN VITRO</i> PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA NA DILUIÇÃO 1/100. AUMENTO 1000X.	75
FIGURA 14 - COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DOS RESULTADOS DA REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA DE	

	IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO NA DILUIÇÃO 1/100, FRENTE A AMOSTRAS DE CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>L. (L.) amazonensis</i>	76
FIGURA 15 -	PROMASTIGOTAS DE <i>L. (L.) amazonensis</i> OBTIDAS DE CULTURA <i>IN VITRO</i> PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA NA DILUIÇÃO 1/100. AUMENTO 1000X	77
FIGURA 16 -	COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DOS RESULTADOS DA REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA DE IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO NA DILUIÇÃO 1/100, FRENTE A AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM <i>L. (V.) braziliensis</i>	78
FIGURA 17 -	COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DOS RESULTADOS DA REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA DE IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO NA DILUIÇÃO 1/100, FRENTE A AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM <i>L. (L.) amazonensis</i>	80
FIGURA 18 -	FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>L. (V.) braziliensis</i> , OBTIDAS DE BIÓPSIA (CORTES HISTOLÓGICOS) PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE IMUNOHISTOQUÍMICA COM ANTICORPOS POLICLONAIS (IgG - SX) ANTIANTÍGENO INSOLÚVEL DE <i>L. (V.) braziliensis</i> . AUMENTO DE 1000X.....	81
FIGURA 19 -	FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>L. (L.) amazonensis</i> , OBTIDAS DE BIÓPSIA (CORTES HISTOLÓGICOS) PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE IMUNOHISTOQUÍMICA COM ANTICORPOS POLICLONAIS (IgG - SX) ANTIANTÍGENO INSOLÚVEL DE <i>L. (L.) amazonensis</i> . AUMENTO DE 1000X.....	82
FIGURA 20 -	IMUNOCITOQUÍMICA DE <i>L. (L.) amazonensis</i> , (FORMAS PROMASTIGOTAS) E <i>Candida albicans</i> PARA AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE, COM ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI- <i>L. (L.) amazonensis</i> NA DILUIÇÃO DE 1/100. AUMENTO DE 400X.....	83
FIGURA 21 -	COLORAÇÃO DE MAY-GRÜNWARDL - GIEMSA EM PREPARAÇÃO CONTENDO <i>L. (L.) amazonensis</i> E <i>Candida albicans</i> . AUMENTO DE 1000X.....	83
FIGURA 22 -	ESTABILIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI- <i>L. (V.) braziliensis</i> EM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO NA DILUIÇÃO 1/100, AVALIADO NO PERÍODO DE 12 MESES A - 20 °C.....	87
FIGURA 23 -	ESTABILIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI- <i>L. (L.) amazonensis</i> EM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO NA DILUIÇÃO 1/100, AVALIADO NO PERÍODO DE 12 MESES A - 20 °C	88
FIGURA 24 -	PERFIL DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DE BIÓPSIAS DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LEISHMANIOSE (LINHAS 2 A 7); DE ANIMAIS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE (LINHAS 8	

<p>A 11); CEPA REFERÊNCIA DE <i>L. (V.) braziliensis</i> (LINHA 12); <i>L. (L.) amazonensis</i> (LINHA 13) E CONTROLE NEGATIVO (LINHA 14). AMPLIFICADOS COM OS INICIADORES b1 E b2. MARCADOR MOLECULAR 100 PB DNA LADDER (INVITROGEN) (LINHA 1).....</p>	92
<p>FIGURA 25 - IMUNOHISTOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICO, COM COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA-EOSINA, DE MATERIAL DE BIÓPSIA PARA DETECÇÃO DE FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i>. AUMENTO DE 400X (A) E 1000X (B).</p>	93
<p>FIGURA 26 - IMUNOHISTOQUÍMICA DE BIÓPSIA DE LESÃO ATIVA DE LTA, COM REAÇÃO POSITIVA PARA ANTÍGENOS DE <i>Leishmania</i> EM CITOPLASMA DE CÉLULAS GIGANTES (PADRÃO CELULAR). AUMENTO DE 1000X.....</p>	94

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - LEISHMANIOSES DO NOVO MUNDO, SEUS AGENTES ETIOLÓGICOS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	22
TABELA 2 - CONCENTRAÇÃO PROTÉICA (mg/ml) E VOLUME (ml) PRODUZIDOS PELO ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE <i>L. (V.) brasiliensis</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	61
TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO PROTÉICA (%) E BIOMASSA (g) PRODUZIDOS PELOS ANTÍGENOS INSOLÚVEIS DE <i>L. (V.) brasiliensis</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	61
TABELA 4 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM ANIMAIS IMUNIZADOS COM ANTÍGENOS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS DE <i>Leishmania</i> (DILUIÇÃO 1/100)	62
TABELA 5 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM ANIMAIS IMUNIZADOS COM ANTÍGENOS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS DE <i>Leishmania</i> (DILUIÇÃO 1/200)	63
TABELA 6 - CONCENTRAÇÃO PROTÉICA (mg/ml) E VOLUME (ml) OBTIDO DAS IMUNOGLOBULINAS EXTRAÍDAS POR SULFATO DE AMÔNIO DOS SOROS HIPERIMUNES	65
TABELA 7 - ATIVIDADE DAS IMUNOGLOBULINAS (ABSORBÂNCIA) EXTRAÍDAS DOS SOROS HIPERIMUNES SUBMETIDAS AO MÉTODO DE ELISA NAS DILUIÇÕES DE 1/100 E 1/200.	65
TABELA 8 - CONCENTRAÇÃO PROTÉICA (mg/ml) E VOLUME (ml) OBTIDO DAS IMUNOGLOBULINAS PURIFICADAS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX®	66
TABELA 9 - ATIVIDADE DAS IMUNOGLOBULINAS (ABSORBÂNCIA) PURIFICADAS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX® SUBMETIDAS AO MÉTODO DE ELISA NAS DILUIÇÕES DE 1/100 E 1/200	66
TABELA 10 - RESULTADOS DA ADERÊNCIA (QUANTIDADE DE PARASITAS FIXADOS), EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM E FIXAÇÃO, DE AMOSTRAS DE CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>L. (V.) brasiliensis</i>	67
TABELA 11 - RESULTADOS DA ADERÊNCIA (QUANTIDADE DE PARASITAS FIXADOS), EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM E FIXAÇÃO, DE AMOSTRAS DE CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>L. (L.) amazonensis</i>	67
TABELA 12 - RESULTADOS DA INTEGRIDADE MORFOLÓGICA DOS PARASITAS, EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM E FIXAÇÃO, DE AMOSTRAS DE CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>L. (V.) brasiliensis</i>	68
TABELA 13 - RESULTADOS DA INTEGRIDADE MORFOLÓGICA DOS PARASITAS, EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS	

PRELIMINARES DE SECAGEM E FIXAÇÃO, DE AMOSTRAS DE CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>L. (L.) amazonensis</i>	68
TABELA 14 - RESULTADOS DA ADERÊNCIA (QUANTIDADE DE PARASITAS FIXADOS), EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM E FIXAÇÃO, DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM <i>L. (V.) braziliensis</i>	68
TABELA 15 - RESULTADOS DA ADERÊNCIA (QUANTIDADE DE PARASITAS FIXADOS), EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM E FIXAÇÃO, DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM <i>L. (L.) amazonensis</i>	69
TABELA 16 - RESULTADOS DA INTEGRIDADE MORFOLÓGICA DOS PARASITAS, EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM E FIXAÇÃO, DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM <i>L. (V.) braziliensis</i>	69
TABELA 17 - RESULTADOS DA INTEGRIDADE MORFOLÓGICA DOS PARASITAS, EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM E FIXAÇÃO, DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM <i>L. (L.) amazonensis</i>	69
TABELA 18 - IMUNOCITOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>L. (V.) braziliensis</i> , COM IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO (DILUIÇÃO DE 1/100)	73
TABELA 19 - IMUNOCITOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>L. (L.) amazonensis</i> , COM IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO (DILUIÇÃO DE 1/100)	75
TABELA 20 - IMUNOCITOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM <i>L. (V.) braziliensis</i> E IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO (DILUIÇÃO DE 1/100)	77
TABELA 21 - IMUNOCITOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM <i>L. (L.) amazonensis</i> E IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO (DILUIÇÃO DE 1/100)	79
TABELA 22 - IMUNOHISTOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM <i>L. (V.) braziliensis</i> E IMUNOGLOBULINAS PURIFICADAS (DILUIÇÃO DE 1/100)	79
TABELA 23 - IMUNOHISTOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM <i>L. (L.) amazonensis</i> E IMUNOGLOBULINAS PURIFICADAS (DILUIÇÃO DE 1/100)	81

TABELA 24 - ESPECIFICIDADE DOS SOROS HIPERIMUNES E ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI- <i>L. (V.) braziliensis</i> (Ag insolúvel), EM IMUNOCITOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE CULTURAS <i>IN VITRO</i>	84
TABELA 25 - ESPECIFICIDADE DOS SOROS HIPERIMUNES E ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI- <i>L. (L.) amazonensis</i> (Ag insolúvel), EM IMUNOCITOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE CULTURAS <i>IN VITRO</i>	85
TABELA 26 - ESTABILIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI- <i>L. (V.) braziliensis</i> EM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (DILUIÇÃO 1/100).....	86
TABELA 27 - ESTABILIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI- <i>L. (L.) amazonensis</i> EM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (DILUIÇÃO 1/100).....	88
TABELA 28 - MANUTENÇÃO DA REATIVIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI- <i>L. (V.) braziliensis</i> EM PREPARAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA (DILUIÇÃO 1/100).....	89
TABELA 29 - MANUTENÇÃO DA REATIVIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI- <i>L. (L.) amazonensis</i> EM PREPARAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA (DILUIÇÃO 1/100).....	89
TABELA 30 - HISTOPATOLOGIA PARA PESQUISA DE AMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i> EM BIÓPSIAS DE CASOS SUSPEITOS DE LTA, COM COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA-EOSINA. AUMENTO DE 1000X.....	91
TABELA 31 - COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS PARA A DETECÇÃO DE AMASTIGOTAS E ANTÍGENOS DE <i>Leishmania</i> EM MATERIAL DE BIÓPSIAS DE LESÕES.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	-	Complexo Avidina-Biotina
Abs	-	Absorbância
Ag	-	Antígeno
APAAP	-	Fosfatase Alcalina Anti-Fosfatase Alcalina
DAB	-	3,3' Diaminobenzidina
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	-	Deoxinucleotídeo trifosfato
DP	-	Desvio-Padrão
ELISA	-	Ensaio imunoenzimático (enzimaímunensaio)
FUNASA	-	Fundação Nacional de Saúde
HE	-	Hematoxilina-Eosina
HRP	-	Anti-horseradish peroxidase
ICQ	-	Imunocitoquímica
IDRM	-	Intradermo Reação de Montenegro
IFI	-	Imunofluorescência Indireta
IgG	-	Imunoglobulinas da Classe G
IgG 1	-	Imunoglobulinas da Classe G subclasse 1
IgG 3	-	Imunoglobulinas da Classe G subclasse 3
IgG 4	-	Imunoglobulinas da Classe G subclasse 4
IHQ	-	Imunohistoquímica
L.	-	Gênero <i>Leishmania</i> .
(L.)	-	Subgênero <i>Leishmania</i>
LC	-	Leishmaniose Cutânea
LCD	-	Leishmaniose Cutânea-Difusa
LM	-	Leishmaniose Mucosa
LPG	-	Lipofosfoligano
LSAB	-	<i>Labelled streptavidin – biotin</i>
LTA	-	Leishmaniose Tegumentar Americana
Lu.	-	Gênero <i>Lutzomyia</i>
Nº	-	Número
ND	-	Não determinado
NNN	-	Meio de Novy e McNeal modificado por Nicolle
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
OPD	-	Orto-fenileno-diamino
PAP	-	Peroxidase anti-peroxidase
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
RAPD	-	Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
RNA	-	Ácido Ribonucleico
RPM	-	Rotações por Minuto
RT	-	Transcriptase Reversa
(V.)	-	Subgênero <i>Viannia</i>
WHO	-	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	-	Por cento
°C	-	Graus Celsius
<	-	Menor que
=	-	Igual
A ₂₈₀	-	Absorbância a 280 nm
G2D10	-	Anticorpo Monoclonal Anti- <i>Leishmania</i>
HCl	-	Ácido clorídrico
HPI	-	Soro hiperimune
IFN - γ	-	Interferon gama
IgG -SA	-	Imunoglobulinas extraídas com sulfato de amônio
IgG -SX	-	Imunoglobulinas purificadas por cromatografia em coluna com SEPHADEX®
IL - 4	-	Interleucina quatro
IL - 5	-	Interleucina cinco
IL - 10	-	Interleucina dez
KCl	-	Cloreto de potássio
KD	-	Kilo Dalton
kDNA	-	Ácido Desoxirribonucléico Circular
LS	-	Lâmina Silanizada
LC	-	Lâmina Comum
M	-	molar
mg	-	miligrama
MgCl ₂	-	Cloreto de magnésio
ml	-	mililitro
mm	-	milímetro
mM	-	milimolar
ng	-	nanograma
NH ₂	-	Grupo amina
nm	-	nanômetro
p	-	Proporção
pb	-	Pares de base
PBS	-	Tampão fosfato
pH	-	Potencial dos ions hidrogênio
pmol	-	picomol
SFB	-	Soro Fetal Bovino
SF	-	Soro Fisiológico
HPI	-	Soro Hiperimune
TCD4 ⁺	-	Células T com co-receptor CD4
TCD8 ⁺	-	Células T com co-receptor CD8
TGF- β	-	Fator de Crescimento Tumoral beta
TNF - α	-	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRIS	-	Tris (hidroximetil) aminometano
U	-	Unidades
v/v	-	volume por volume
μ l	-	microlitro
μ m	-	micrômetro
X	-	Vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	SISTEMÁTICA.....	21
3.2	ASPECTOS MORFOLÓGICOS.....	23
3.3	CICLO BIOLÓGICO E DINÂMICA DE TRANSMISSÃO DA INFECÇÃO.....	26
3.4	ETIOPATOGENIA.....	28
3.5	ASPECTOS CLÍNICOS.....	30
3.5.1	Leishmaniose cutânea	31
3.5.2	Leishmaniose mucosa e mucocutânea	32
3.5.3	Leishmaniose cutânea-difusa.....	33
3.6	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LTA.....	34
3.7	DIAGNÓSTICO DA LTA.....	36
3.7.1	Diagnóstico clínico e epidemiológico.....	36
3.7.2	Diagnóstico laboratorial.....	37
3.7.2.1	Diagnóstico parasitológico - pesquisa do parasito	37
3.7.2.1.1	Esfregaço por aposição e histopatológico.....	37
3.7.2.1.2	Cultura.....	39
3.7.2.1.3	Inoculação em animais	40
3.7.2.2	Diagnóstico molecular.....	41
3.7.2.3	Diagnóstico sorológico - imunofluorescência indireta e enzaimunoensaio.....	42
3.7.2.4	Avaliação da resposta celular - intradermoreação de Montenegro	42
3.8	METODOLOGIAS DE IMUNOCITOQUÍMICA (ICQ)/IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)	43
3.8.1	Fundamentos e histórico.....	43
3.8.2	Pré-requisitos técnicos para as metodologias de ICQ e IHQ.....	44
3.8.3	Características e aplicações da avidina-biotina	45
3.8.4	Métodos imunocitoquímicos de avidina-biotina	46
3.8.5	ICQ e IHQ aplicadas no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	47

4	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1	OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS SOLÚVEL E INSOLÚVEL.....	49
4.2	OBTENÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES.....	50
4.3	PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Leishmania</i>	50
4.4	TRATAMENTO DOS SOROS HIPERIMUNES - EXTRAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS (IgG).....	51
4.5	PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS - ANTICORPOS POLICLONAIS.....	52
4.6	CULTIVO DOS PROTOZOÁRIOS PARA PREPARO DE LÂMINAS.....	53
4.6.1	Cultura <i>in vitro</i>	53
4.6.2	Inoculação experimental.....	53
4.7	DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FIXAÇÃO DE PARASITAS E CONSERVAÇÃO DAS LÂMINAS PARA IMUNOCITOQUÍMICA.....	55
4.8	COLORAÇÃO PELOS MÉTODOS DE MAY-GRÜNWARD - GIEMSA E HEMATOXILINA-EOSINA.....	56
4.9	CULTURA <i>IN VITRO</i> PARA ISOLAMENTO DO PARASITO A PARTIR DE LESÕES.....	57
4.10	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	57
4.11	DILUIÇÃO DOS SOROS HIPERIMUNES E ANTICORPOS POLICLONAIS PARA APLICAÇÃO EM IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA.....	58
4.12	METODOLOGIA DE IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA.....	58
4.13	ESPECIFICIDADE DOS SOROS HIPERIMUNES E ANTICORPOS POLICLONAIS.....	59
4.14	ESTABILIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS.....	59
4.15	COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE AMASTIGOTAS E ANTÍGENOS DE <i>LEISHMANIA</i>	60
4.16	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5	RESULTADOS.....	61
5.1	OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS SOLÚVEL E INSOLÚVEL.....	61
5.2	OBTENÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES.....	61
5.3	TRATAMENTO DOS SOROS HIPERIMUNES - EXTRAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS (IgG).....	64
5.4	PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS (ANTICORPOS POLICLONAIS).....	65

5.5	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM, FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO	66
5.6	COLORAÇÃO PELOS MÉTODOS DE MAY-GRÜNWARD - GIEMSA E HEMATOXILINA-EOSINA	70
5.7	RESULTADOS DA IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA	72
5.8	ESPECIFICIDADE DOS SOROS HIPERIMUNES E ANTICORPOS POLICLONAIS	82
5.9	ESTABILIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS	85
5.10	COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE AMASTIGOTAS E ANTÍGENOS DE <i>LEISHMANIA</i>	90
6	DISCUSSÃO	95
7	CONCLUSÕES	107
	REFERÊNCIAS	108
	ANEXOS	117

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença de caráter zoonótico, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida pela picada de insetos de diferentes espécies da família Phlebotominae, que acometendo o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos, é endêmica em diversas áreas, tanto no novo quanto no velho mundo, com exceção da Austrália. Estudos epidemiológicos apontam o surgimento de novos focos em diversos países (WHO, 2004). A epidemiologia da doença é extremamente complexa, pois seu agente etiológico está presente em uma grande diversidade de vetores e reservatórios naturais e apresenta, também, particularidades quanto à distribuição geográfica e até mesmo à resposta terapêutica.

A infecção caracteriza-se pelo parasitismo de células do sistema fagocítico mononuclear, sendo considerada uma enfermidade polimórfica e espectral da pele e mucosas de vias aéreas superiores. As principais manifestações observadas nos pacientes com LTA podem ser classificadas de acordo com seus aspectos clínicos, patológicos e imunológicos. A ocorrência de diferentes formas clínicas da doença está na dependência de variáveis como fatores ligados a espécies e cepas do parasito, hábitos do vetor, fatores ligados à resposta imune do hospedeiro e, conseqüentemente, fatores resultantes da interação parasito-hospedeiro (MARZOCHI, 1992; AZULAY & AZULAY, 1995; OLIVEIRA-NETO, 1998). A forma cutânea localizada é caracterizada por lesões ulcerosas, indolores, única ou múltiplas, com bordas salientes em forma de moldura. A forma cutaneomucosa, por sua vez, é caracterizada por lesões mucosas agressivas que afetam as regiões nasofaríngeas. A forma disseminada apresenta múltiplas úlceras cutâneas por disseminação hematogênica ou linfática e, por fim, a forma difusa apresenta lesões nodulares não-ulceradas e ricas em parasitos em indivíduos anérgicos (DEDET *et al.*, 1999).

Aproximadamente quatrocentos milhões de pessoas vivem em áreas de risco, sendo que a estimativa anual de incidência no mundo chega a 2.000.000 de casos (WHO, 2004). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, ocorreram aproximadamente 523.975 casos autóctones, principalmente nas regiões norte e

nordeste, entre 1985 e 2003 (BRASIL, 2007).

A doença já é endêmica em 88 países apesar de ser assinalada como tal em apenas 30 deles, sendo que 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Brasil e Peru. Nas Américas, a leishmaniose cutânea se distribui desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (ARIAS *et al.*, 1996). Os únicos países sem casos relatados são Canadá, Chile e Uruguai (DESJEUX, 1999; WHO, 1990).

Estes exemplos de alta incidência da doença, com grande número de indivíduos com lesões incapacitantes, desfigurantes e algumas vezes fatais, como nas leishmanioses viscerais, levaram a OMS a incluir esta doença entre as seis mais importantes do mundo (WHO, 1990; ASHFORD *et al.*, 1991; WIJEYARATNE *et al.*, 1992).

O tratamento da LTA foi introduzido pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912, com o uso de antimonial tártaro emético. Esta droga, durante muitos anos, constituiu-se na única opção terapêutica em todo o mundo. Atualmente, utiliza-se um antimonial pentavalente, o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime), que deve ser utilizado com cautela por apresentar freqüentes efeitos colaterais, como artralgia, mialgia, náuseas, vômitos, epigastria e até insuficiência renal aguda e cardíaca (BERMAN, 1996; FUNASA, 2000; DEF, 2006).

A despeito da evolução terapêutica, muito pouco se avançou em termos de controle da doença, que vem acometendo as populações, sob risco de forma continuada e crescente (SABROZA, 1981; TALHARI *et al.*, 1988; GRIMALDI *et al.*, 1989; MARZOCHI & MARZOCHI, 1997; OLIVEIRA-NETO, 1998).

Os métodos atualmente disponíveis para o diagnóstico da LTA, além do clínico, nas formas típicas, são baseados na pesquisa direta do parasita nas lesões, por exame direto de esfregaços corados, exame histopatológico, culturas e inóculo em animais. No diagnóstico sorológico, aplicável em estudos epidemiológicos, utilizam-se os métodos de ELISA (enzimaimunoensaio) e IFI (imunofluorescência indireta) (CHIARI *et al.*, 1973; FURTADO, 1980; THIERRY *et al.*, 1991). Para os métodos de biologia molecular para pesquisa do DNA do parasita, a técnica de PCR (*polimerase chain reaction*) tem sido a mais utilizada, pois além da aplicação no diagnóstico, tem permitido a caracterização de

diferenças moleculares e bioquímicas do agente etiológico (CASTILHO *et al.*, 2003; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2003). Para a avaliação da resposta celular, o método de escolha é o teste de Montenegro. Porém, todas as metodologias utilizadas apresentam limitações em sua aplicação.

Considerado que as dificuldades e restrições de caráter técnico-científico, sociais e administrativos também resultam em conseqüências negativas para os serviços laboratoriais, é inevitável que se observem deficiências no correto diagnóstico da doença, ocasionadas pela falta de pessoal capacitado e pela precária estrutura técnica de apoio ao diagnóstico (JONES *et al.*, 1987; MODABBER, 1993).

Estas lacunas no diagnóstico da LTA, têm acarretado um custo financeiro e social, decorrente do tratamento inadequado e também dificultado a vigilância e o monitoramento da doença, o que justifica o desenvolvimento de metodologias que auxiliem e complementem o diagnóstico, o que propõe o presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver insumos e padronizar metodologias de imunocitoquímica e imunohistoquímica, capazes de identificar, em esfregaços e biópsias de lesões, formas amastigotas e antígenos de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Produzir antígenos solúveis e insolúveis de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* para a sensibilização de coelhos e produção de anticorpos policlonais.

Produzir e purificar anticorpos policlonais anti *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* para utilização no sistema diagnóstico.

Desenvolver e padronizar as metodologias de imunocitoquímica e imunohistoquímica para demonstrar a presença de formas amastigotas e antígenos de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, com utilização do sistema de detecção estreptavidina – biotina e anticorpos específicos.

Determinar a sensibilidade, especificidade e estabilidade do sistema para o diagnóstico laboratorial da Leishmaniose Tegumentar Americana.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SISTEMÁTICA

O gênero *Leishmania* Ross, 1903, agrupa espécies de protozoários unicelulares, digenéticos (heteroxenos), pertencentes ao filo Protozoa, subfilo Sarcostigophora, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae (LAINSON & SHAW, 1987).

Quanto à origem do gênero *Leishmania*, pode-se considerá-la monofilética a partir de hipóteses moleculares (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993). Seu surgimento teria ocorrido à época da Pangea, há cerca de 120 milhões de anos e se espalhado por todas as regiões desde então, tomando um elevado grau de diversidade com o passar dos milênios (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993; CUPOLILLO *et al.*, 2000).

Com a finalidade de correlacionar o polimorfismo clínico das leishmanioses com a distribuição geográfica, aspectos epidemiológicos, reservatórios e o comportamento biológico das cepas isoladas, foram realizados estudos com métodos bioquímicos, imunológicos e de biologia molecular, como a hibridização de ácido desoxirribonucleico (DNA), e a caracterização por anticorpos monoclonais ou por isoenzimas (GRIMALDI & TESH, 1993; CUPOLILLO *et al.*, 2000; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2003). Várias classificações taxonômicas surgiram a partir da aplicação destes métodos que, somados à análise molecular com vários alvos diferentes do genoma do parasito, têm contribuído para o estabelecimento da taxonomia e filogenia de *Leishmania*, como também na compreensão da complexidade epidemiológica dessa parasitose.

Na classificação taxonômica das espécies, proposta por Lainson e Shaw (1987), atualmente a mais utilizada, as espécies de *Leishmania* são divididas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* (Tabela 1). Na América Latina, os parasitos identificados como causadores de leishmaniose tegumentar são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* (JONES *et al.*, 1987; GRIMALDI *et al.*, 1991; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993; ASHFORD, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2004).

TABELA 1 – LEISHMANIOSES DO NOVO MUNDO, SEUS AGENTES ETIOLÓGICOS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.

Espécies de <i>Leishmania</i>	Lesões causadas no homem	Distribuição geográfica
Sub Gênero <i>Viannia</i>		
Complexo <i>L. braziliensis</i>		
<i>L.(V.) braziliensis</i>	Cutâneas e mucosas	América Central e do Sul, até o norte da Argentina
<i>L.(V.) peruviana</i>	Predominantemente cutâneas	Altos vales andinos e encosta Ocidental dos Andes
Complexo <i>L. guyanensis</i>		
<i>L.(V.) guyanensis</i>	Predominantemente cutâneas e vias linfáticas	Países do noroeste e norte da América do Sul, até o rio Amazonas
<i>L.(V.) panamensis</i>	Predominantemente cutâneas e vias linfáticas	América Central e costa pacífica da América do Sul
<i>L.(V.) shawi</i>	Casos raros com lesões cutâneas	Norte do Estado do Pará
Complexo <i>L. naiffii</i>		
<i>L.(V.) naiffii</i>	Casos raros com lesões cutâneas	Região Amazônica e Peru
Complexo <i>L. lainsoni</i>		
<i>L.(V.) lainsoni</i>	Predominantemente cutâneas	Região Amazônica
Sub Gênero <i>Leishmania</i>		
Complexo <i>L. mexicana</i>		
<i>L.(L.) mexicana</i>	Cutâneas e, eventualmente, Cutâneo-difusas	México e América Central
Complexo <i>L. amazonensis</i>		
<i>L.(L.) amazonensis</i>	Cutâneas e, eventualmente, Cutâneo-difusas	América Central e norte, nordeste e sul do Brasil
<i>L.(L.) venezuelensis</i>	Cutâneas e, eventualmente, Cutâneo-difusas	Venezuela
Complexo <i>L. infantum</i>		
<i>L.(L.) infantum</i> (sinonímia <i>L. (L.) chagasi</i>)	Lesões viscerais (calazar)	Do sul dos EUA ao norte da Argentina, com predominância no nordeste brasileiro

FONTE: THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993

3.2 ASPECTOS MORFOLÓGICOS

O ciclo de vida do parasito é digenético, ou seja, ocorre a infecção alternada entre um hospedeiro intermediário vetor (portador da forma promastigota em seu trato digestório) e outro hospedeiro definitivo (portador da forma amastigota parasitando o interior das células do seu sistema fagocítico mononuclear). A morfologia das formas evolutivas dos parasitos apresenta, de certa forma, semelhanças entre as diferentes espécies. Essa semelhança contribuiu, por muito tempo, para a divulgação e persistência do conceito errôneo de que por meio desta característica os parasitos eram indistinguíveis. Em decorrência disso, muitas observações morfológicas sobre diferentes parasitos foram pouco valorizadas na identificação e classificação das espécies (ANTOINE *et al.*, 1999; HANDMAN, 1999).

As amastigotas são estruturas arredondadas, com flagelo rudimentar não exteriorizado, que se localizam em vacúolos parasitóforos de células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados, principalmente macrófagos. Em esfregaços, aparecem freqüentemente fora das células em consequência da ruptura destas. As amastigotas fixadas e coradas pelos métodos derivados do *Romanovsky*, como Giemsa e Leishman, aparecem à microscopia óptica como organismos ovais ou esféricos. No citoplasma, corado em azul-claro, são observados o núcleo grande e arredondado ocupando, às vezes, um terço do corpo do parasito, o cinetoplasto, em forma de um pequeno bastonete, ambos corados em vermelho púrpura, além de vacúolos, que podem ser ou não visualizados. Não há flagelo livre e sua porção intracitoplasmática raramente é visível. Os limites micrométricos de seus diâmetros são de aproximadamente 1,5 a 3,0 por 3,0 a 6,5 μm (LAINSON & SHAW, 1987; ANTOINE *et al.*, 1999; HANDMAN, 1999) (Figura 1).

Quando examinados ao microscópio eletrônico de transmissão, observa-se o envoltório da forma amastigota é formado por uma unidade de membrana, sob a qual são dispostos, em conformação regular e equidistante, microtúbulos, em número variável. Nas diferentes espécies de *Leishmania*, a membrana apresenta uma invaginação na região anterior do corpo do parasito, formando a bolsa flagelar, onde se localiza o flagelo. Nesse local não são encontrados microtúbulos subpeliculares e são

grandes as atividades excretora e de pinocitose. O flagelo apresenta microestrutura formada por nove pares de microtúbulos concêntricos e um par central, envolvido por uma matriz citoplasmática. O cinetoplasto mostra-se como uma estrutura mitocondrial ligada à única mitocôndria existente na célula. No seu interior, encontram-se estruturas filamentosas circulares, formadas por ácido desoxirribonucléico, denominado kDNA. O blefaroplasto ou corpúsculo basal aparece como a continuação do flagelo. O núcleo possui configuração variada, tendendo à esférica, ora denso, ora mais frouxo, mostrando um cariossomo central ou excêntrico, com a cromatina em disposição variável. São observados, na matriz citoplasmática, o aparelho de Golgi e o retículo endoplasmático, além de vacúolos e inclusões (LAINSON & SHAW, 1987; ANTOINÉ *et al.*, 1999; HANDMAN, 1999).

A forma promastigota é provida de flagelo livre e desenvolve-se no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e em culturas axênicas, em temperatura ambiente (24 °C). Apresentam de 11 a 18,5 µm de comprimento por 3 a 4 µm de largura, com o flagelo medindo de 14 a 20 µm. Nos preparados corados pelo Giemsa ou outro corante derivado do Romanowski, a forma promastigota típica é observada com uma extremidade anterior mais larga, de onde sai o flagelo, e uma extremidade posterior, mais delgada e alongada. No interior do citoplasma, notam-se grânulos intensamente corados em vermelho púrpura (azurófilos), em geral mais abundantes na parte posterior. Observam-se também pequenos vacúolos. O núcleo é arredondado ou ovóide e tem a mesma estrutura que na forma amastigota. O cinetoplasto apresenta-se em geral ovóide ou em forma de bastonete, podendo ser também arredondado e situa-se na extremidade anterior ou na porção medial entre o núcleo e a extremidade anterior (Figura 2). Estruturalmente, na microscopia eletrônica, as formas flageladas diferenciam-se da forma amastigota essencialmente pelo prolongamento do flagelo, que se exterioriza para além da bolsa flagelar. Estruturas de membranas, núcleo, cinetoplasto e organelas citoplasmáticas são semelhantes (LEVINE *et al.*, 1980; ANTOINÉ *et al.*, 1999).

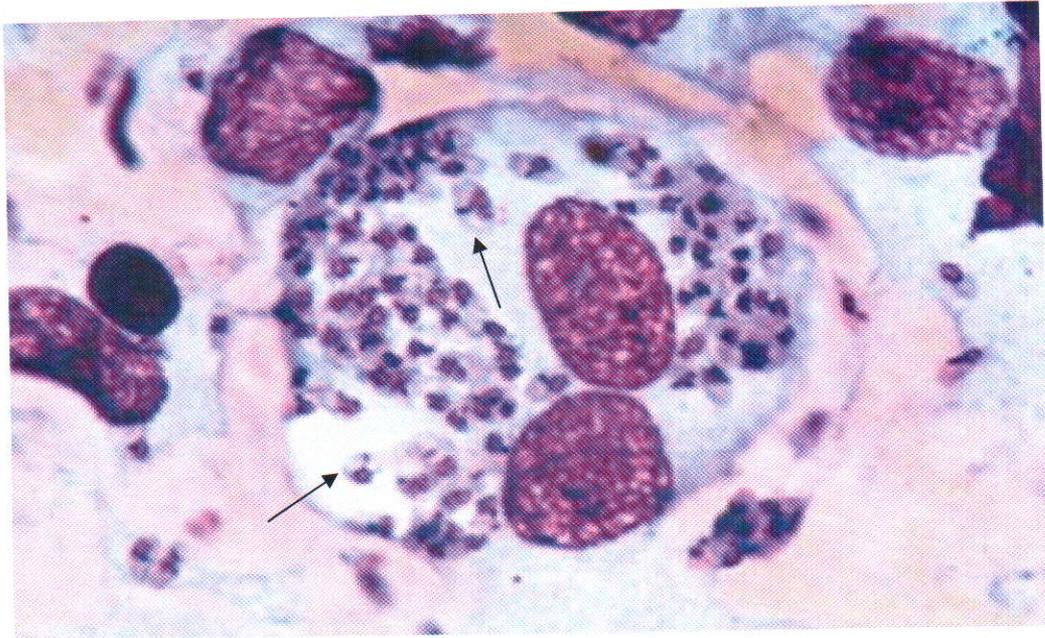


FIGURA 1 – FORMAS AMASTIGOTAS DE *Leishmania sp.*
Formas amastigotas na impressão de fragmento de tecido em lâmina corado por Giemsa.
(Foto original. Aumento 1000x)

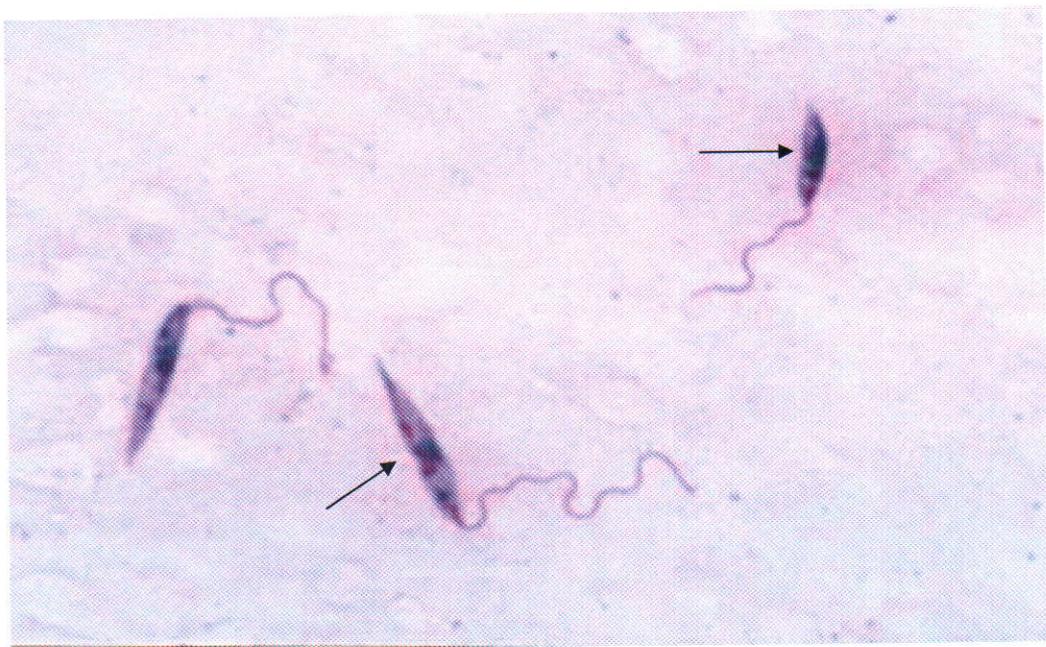


FIGURA 2 – FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania sp.*
Formas promastigotas em amostra de cultura em meio de Tobie-Evans, corado por Giemsa. (Foto original. Aumento 1000x)

3.3 CICLO BIOLÓGICO E DINÂMICA DE TRANSMISSÃO DA INFECÇÃO

As leishmanioses constituem, com raras exceções, zoonoses de animais silvestres e, mais raramente, domésticos. O homem representa um hospedeiro acidental e, portanto, não aparenta possuir um papel importante na manutenção dos parasitas no ecossistema (FURTADO, 1994). O reservatório primário seria então um hospedeiro habitual, com papel primordial na perpetuação de determinada espécie do protozoário. O reservatório secundário seria um hospedeiro eventual, por representar uma fonte alimentar pouco habitual para o inseto vetor, ou por ser menos suscetível ao parasita. Como hospedeiro acidental, observa-se no homem uma reação mais intensa à invasão do parasita, determinando um comportamento mais agressivo da doença no ser humano. Nos animais, são freqüentes as infecções inaparentes, caracterizando uma relação mais antiga e equilibrada em termos de evolução (FALQUETO & FERREIRA, 2005).

A transmissão das diferentes espécies de *Leishmania* ocorre pela picada de insetos hematófagos fêmeas, pertencentes à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, denominados genericamente de flebotomíneos. Os insetos são representados por centenas de espécies, a maioria incluída nos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, ocupando extensas áreas geográficas, em diversos continentes (LAINSON & SHAW, 1987; SACKS & KAMHAWI, 2001).

As formas promastigotas do parasito podem ser encontradas aderidas à parede intestinal do inseto em pontos diferentes, por meio de hemidesmossomos ou livres no lúmen, em processo de multiplicação. As formas infectantes, promastigotas metacíclicas, são encontradas principalmente livres ou aderidas à porção anterior do aparelho bucal, mais especificamente no proventrículo e na faringe (KILLICK-KENDRICK, 1990). Os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas infectantes são inoculadas, pelas fêmeas dos insetos vetores, durante o repasto sangüíneo. Devido ao seu curto aparelho bucal, os flebotomíneos são incapazes de canular pequenos vasos da derme, provocando então lesões neste microambiente no qual as formas promastigotas metacíclicas encontrarão diversas substâncias, incluindo proteínas do soro, saliva e fluidos digestivos do inseto. Nos

componentes do hospedeiro, destacam-se as proteínas do complemento, os anticorpos IgG e a fibronectina. Durante este repasto, a saliva do inseto é também inoculada e parece exercer papel importante, não só na lise do tecido adjacente, favorecendo o fluxo de sangue e linfa intersticial para o alimento, como pela ação de substâncias nela contidas, capazes de promover a vasodilatação. Esta vasodilatação facilita o permeio de células para o local, além de provavelmente inibir a apresentação de antígenos de *Leishmania* aos macrófagos (LAINSON & SHAW, 1987; SACKS & KAMHAWI, 2001).

O processo de adesão das promastigotas infectantes ao macrófago tem a participação de anticorpos da classe IgG e fibronectinas, por meio de receptores para porção Fc das imunoglobulinas. As diversas espécies de *Leishmania* são capazes de ativar o complemento tanto pela via clássica como pela via alternativa. Os fatores do complemento, principalmente o C3 e seus produtos de clivagem C3b, C3bi e C3dg, favorecem a fagocitose, uma vez que macrófagos possuem receptores específicos para eles (CR1, CR2, CR3 e CR4). O complexo lítico final do complemento (C5-9) é capaz de aderir à superfície dos promastigotas e provocar a lise destas formas. Entretanto, os lipofosfossacarídeos dos parasitos interferem na inserção do complexo C5-9, provavelmente por impedimento estérico produzido pelo espessamento do LPG (lipofosfoglicano). Além do LPG, a glicoproteína gp63 e alguns carboidratos, notadamente fucose e manose, estão envolvidos na ligação do parasito com a célula hospedeira (SACKS & KAMHAWI, 2001).

Após a interiorização, o macrófago promove a fusão dos lisossomos com o fagossomo e o parasito. Para sua adaptação às condições do novo ambiente, o parasito começa a sofrer o processo de transformação para a forma amastigota, intracelular obrigatória, capaz de desenvolver-se e multiplicar-se no meio ácido encontrado no vacúolo digestivo parasitado. Neste papel de sobrevivência destacam-se a LPG, devido à sua ação inibidora de enzimas hidrolíticas e da proteína C quinase, responsável pelo desencadeamento da explosão respiratória. A multiplicação, por divisão binária simples, é iniciada pela duplicação do cinetoplasto, um dos quais mantém o flagelo remanescente, enquanto o outro promove a reprodução da estrutura flagelar. A seguir, o núcleo divide-se e na seqüência o corpo do parasita se funde, no sentido ântero-posterior. Após sucessivas multiplicações, na ausência do controle

parasitário pela célula hospedeira, esta se rompe e as amastigotas liberadas serão fagocitadas por outros macrófagos. A infecção para o hospedeiro invertebrado ocorre no momento do repasto sanguíneo que tanto ocorre em humanos ou animais infectados. As formas amastigotas estão presentes no sangue e ou na linfa intersticial (ANTOINE *et al.*, 1999; HANDMAN, 1999) (Figura 3).

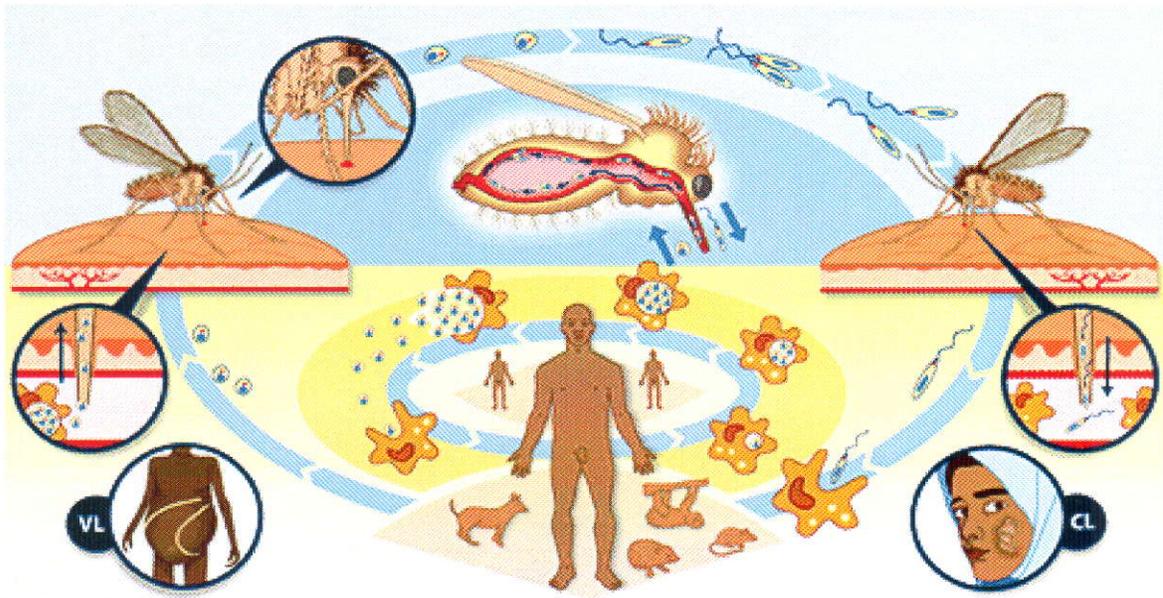


FIGURA 3 – CICLO BIOLÓGICO DE *Leishmania sp*
 FONTE: OMS (2005)

3.4 ETIOPATOGENIA

O curso evolutivo da infecção é diretamente relacionado ao perfil da resposta imune celular. O surgimento antecipado da resposta imune pode preceder o aparecimento do comprometimento tegumentar ou controlar a infecção, evitando o surgimento de lesões cutâneas em alguns casos (ROCHA *et al.*, 1999). Na leishmaniose humana, as subpopulações de linfócitos T circulantes e o painel de citocinas (IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-5, IL-10) produzidos por estas células estão associados aos processos de desenvolvimento da doença, evolução para a cura ou

proteção contra a doença (DE LUCA *et al.*, 1999; DA CRUZ *et al.*, 2002).

Na evolução da doença após a picada do inseto, na maioria dos casos, observa-se o desenvolvimento de lesões cutâneas. As lesões apresentadas nestes casos são freqüentemente benignas e com tendência à cura, indicando modulação apropriada da resposta imune. A evolução para a cura está associada à indução de citocinas do tipo 1 e ausência de IL-4. O padrão de citocinas produzidos por células T reativas à *Leishmania* evidencia um perfil misto tipo 1 (IFN- γ) e tipo 2 (IL-4, IL-5) durante a fase ativa da LTA, com um predomínio do tipo 1 nas lesões cutâneas (PIRMEZ *et al.*, 1993; COUTINHO *et al.*, 1996).

A resposta imune celular de indivíduos portadores de LTA frente a antígenos de *Leishmania* pode ser demonstrada por teste *in vivo* como o teste de intradermorreação de Montenegro e pelo teste de proliferação linfocitária *in vitro*. A resposta imune celular é variável de acordo com o estado clínico dos pacientes, estando presente naqueles acometidos pela forma cutânea, é exacerbada nos casos de lesões de mucosas e usualmente suprimida nos casos de leishmaniose difusa. É comum observar resposta imune celular contra antígenos de *Leishmania* nos indivíduos portadores de LTA, mesmo após anos do tratamento, bem como em indivíduos com leishmaniose cutânea que evoluíram para cura espontânea (COUTINHO *et al.*, 1996).

A caracterização dos linfócitos T circulantes realizada em pacientes de leishmaniose cutânea (LC) mostra uma indução preferencial de células CD4⁺ na doença ativa, enquanto é observado um aumento na proporção de células CD8⁺ durante o processo de cura (DA CRUZ *et al.*, 2002).

Os pacientes com leishmaniose mucosa (LM) desenvolvem uma resposta celular exacerbada, levando a uma maior gravidade das manifestações clínicas. Nas formas cutâneas que apresentam uma evolução favorável, prevalece a resposta do tipo 1, sendo que, nas formas mucosas, observa-se uma expressão mais elevada de IL-4. Nestes pacientes, tem sido demonstrada a maior reatividade das células T específicas (CD4⁺), acompanhada de níveis elevados de anticorpos específicos, quando comparada à forma cutânea localizada (SARAVIA *et al.*, 1989). Apesar da produção de IFN- γ para a ativação de macrófagos e destruição de parasitos, a presença de um perfil do tipo 2 parece anular o efeito das citocinas do tipo 1, explicando a cronicidade e a

dificuldade de resolução das formas mucosas (CONVIT *et al.*, 1993; PIRMEZ *et al.*, 1993). De forma similar ao observado na leishmaniose cutânea, na fase ativa da leishmaniose mucosa também é observada uma indução preferencial de células CD4⁺ reativas a antígenos de *Leishmania* em relação às CD8⁺, e a evolução para a cura, observada mais tardiamente, também é seguida de um equilíbrio entre as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (DA CRUZ *et al.*, 2002).

Na leishmaniose cutâneo-difusa (LCD), encontramos uma depressão reversível da resposta imune celular específica ao parasito, levando à ausência de reatividade de células T aos antígenos de *Leishmania*, tanto *in vivo* (intradermoreação de Montenegro) quanto *in vitro* (resposta proliferativa de linfócitos). Também são observados ausência de produção de IFN- γ e predomínio da resposta tipo 2, resultando na deficiência de ativação de macrófagos e no aumento da proliferação parasitária (CONVIT *et al.*, 1993; BOMFIM *et al.*, 1996).

A resposta imune humoral está normalmente presente em todas as manifestações clínicas de LTA. Os níveis de anticorpos utilizados nos casos de leishmaniose difusa são elevados. Nos casos de leishmaniose cutânea e cutâneo-mucosa, os níveis de anticorpos são baixos ou discretamente aumentados quando ocorre acometimento da mucosa. Após cura clínica, os títulos de anticorpos decrescem, deixando de ser detectados, em alguns casos, em poucos meses. Estudos demonstraram uma variação no padrão de resposta humoral em anticorpos da subclasse IgG, conforme as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar. Observa-se um aumento nos níveis de anticorpos IgG1 e IgG3 nas formas clínicas cutânea e cutâneo-mucosa, enquanto na forma cutâneo-difusa ocorre um aumento nos níveis das classes IgG4 e IgG1 (DE LUCA *et al.*, 1999; DA CRUZ *et al.*, 2002).

3.5 ASPECTOS CLÍNICOS

Clinicamente, a leishmaniose pode assumir distintas formas: cutânea (podendo se agravar para cutâneo-difusa), mucocutânea ou ainda visceral (WHO, 1990; SARAVIA *et al.*, 1989). A leishmaniose visceral é causada por espécies viscerotrópicas,

como a *L.(L.) infantum*, que migram por todo o sistema reticular endotelial. A doença envolve comprometimento dos órgãos internos, especialmente fígado e baço e é caracterizada por anemia, febres irregulares, hepato e esplenomegalia e perda de peso. As leishmanioses cutânea, que corresponde de 50 a 75% dos casos da doença, e mucocutânea são causadas por um maior número de espécies. A LTA apresenta diversas apresentações clínicas (BARRAL *et al.*, 1991), na maior parte referentes às infecções por *L. braziliensis*, com várias classificações propostas. A ocorrência de formas clínicas distintas da doença tem sido demonstrada, sendo dependente de fatores ligados a espécies e cepas do parasita, hábitos do vetor, resposta imune do hospedeiro e fatores resultantes da interação parasito-hospedeiro (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

3.5.1 Leishmaniose cutânea

A leishmaniose cutânea (LC), causada por espécies dermatrópicas de *Leishmania*, é a forma clínica mais freqüente. Posteriormente ao período de incubação, que em geral dura de um a três meses, podendo se estender a até um ano, surge a lesão inicial no local da picada do inseto vetor. Essa forma inicial pode regredir espontaneamente após um breve curso abortivo, pode permanecer estacionária ou evoluir para um nódulo dérmico denominado histiocitoma, localizado sempre no sítio da picada do vetor infectado. O histiocitoma desenvolve-se em diferentes ritmos, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida. Nos estágios iniciais da infecção, histologicamente a lesão é caracterizada pela hipertrofia do extrato córneo e da papila, com acúmulo de histiócitos nos quais o parasito se multiplica. Gradualmente, forma-se um infiltrado celular circundando a lesão, consistindo principalmente em pequenos e grandes linfócitos, entre os quais alguns plasmócitos. Como resultado, forma-se, no local, uma reação inflamatória do tipo tuberculóide. Ocorre necrose, resultando na desintegração da epiderme e da membrana basal, que culmina com a formação de uma lesão úlcero-crostosa. Após a perda da crosta, observa-se uma pequena úlcera, com bordas ligeiramente salientes e fundo recoberto por exsudato seroso ou seropurulento.

Esta lesão progride, desenvolvendo-se em uma típica úlcera leishmaniótica que, por seu aspecto morfológico, pode ser reconhecida imediatamente. Trata-se de uma úlcera de configuração circular, bordos altos em moldura, cujo fundo é granuloso, de cor vermelha intensa, recoberto por exsudato, dependendo da presença de infecções secundárias (OLIVEIRA-NETO, 1998)

As lesões podem assumir, entretanto, outras formas menos características, como seca e hiperkeratótica ou vegetativa framboesiforme, com exsudato purulento. Simultaneamente, ou em seguida ao aparecimento da lesão inicial, pode ocorrer disseminação linfática ou hematogênica, produzindo metástases cutânea, subcutânea ou mucosa (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992). O curso das lesões tende a ser benigno, curando-se espontaneamente num período de meses ou anos, ou, após terapêutica específica, forma-se no local, em substituição à úlcera, uma cicatriz característica, em geral com área despigmentada e com uma leve depressão na pele, com uma fibrose sob a epiderme (OLIVEIRA-NETO, 1998; DEDET, 1999).

3.5.2 Leishmaniose mucosa e mucocutânea

A leishmaniose mucosa (LM) clássica é caracterizada como secundária e metastática, demorando anos para aparecer após a lesão cutânea. O intervalo de tempo entre a infecção inicial e o início das manifestações mucosas é bastante variável, podendo ocorrer dentro de um período de seis anos. Independente de serem escassos os parasitos, as lesões de LM são mais resistentes à terapêutica antimonial e em geral não tendem a evoluir para resolução espontânea (JONES *et al.*, 1987; OLIVEIRA-NETO, 1998).

Na forma mucosa em geral, os pacientes apresentam a formação de crostas, eliminação de secreção serosa ou serossanguinolenta pelo nariz e obstrução nasal, com eritema e infiltração na mucosa. As lesões mucosas são infiltradas, eritematosas, podendo ser úlcero-vegetantes, ulceradas ou vegetantes. A evolução das lesões leva à destruição do septo nasal e ao acometimento por contigüidade do assoalho das fossas nasais, da orofaringe e inclusive da laringe e traquéia. A propagação das lesões,

comprometendo partes moles da face, causa mutilações graves e traumatizantes, podendo raramente levar a complicações, como pneumonia aspirativa, sepse, sufocamento, com conseqüências até mesmo fatais (OLIVEIRA-NETO, 1998).

Leishmania braziliensis é a principal espécie associada aos casos de lesão mucosa, embora outras espécies, como *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, já tenham sido isoladas desta forma clínica. Admite-se que cerca de 3 a 5% dos casos de leishmaniose cutânea causados por *L. braziliensis* desenvolvam a forma mucosa (GRIMALDI & TESH, 1993; OLIVEIRA-NETO, 1998).

A leishmaniose mucocutânea tem sido caracterizada como distinta da LM. Nessa forma, as lesões mucosas são concomitantes às cutâneas, ocorrendo mais raramente o comprometimento da mucosa por contigüidade a lesões de pele na face ou por inoculação direta do parasito. Nestes casos, os parasitos são mais facilmente encontrados nas lesões mucosas do que na LM, embora se constituam formas graves e de tratamento mais difícil (MARZOCHI, 1992; OLIVEIRA-NETO, 1998).

3.5.3 Leishmaniose cutânea-difusa

A leishmaniose cutânea-difusa (LCD) é uma forma clínica incomum de leishmaniose, causada no Brasil por *L. amazonensis* (LAINSON & SHAW, 1987; GRIMALDI & TESH, 1993). A doença apresenta inicialmente características de uma lesão cutânea simples, mas que não responde plenamente ao tratamento, evoluindo progressivamente para a forma difusa. A LCD é caracterizada como uma forma anérgica da leishmaniose tegumentar, na qual a limitação da resposta imune específica aos antígenos de *Leishmania* acarreta em um quadro grave da doença. Clinicamente, a LCD caracteriza-se pela presença de numerosos nódulos, pápulas ou tubérculos, além de infiltração cutânea difusa, em geral sem ulceração das lesões ou acometimento mucoso. Como aspecto marcante, observa-se abundância de parasitos nas lesões, ao contrário da LC e da LM (MARZOCHI, 1992; CONVIT *et al.*, 1993; AZULAY & AZULAY, 1995).

3.6 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LTA

As leishmanioses estão amplamente distribuídas nos diversos continentes, com características epidemiológicas distintas, proporcionadas pelas variáveis geográficas e climáticas de cada região. Em decorrência desta variabilidade e com o processo evolutivo, deu-se o surgimento de ecossistemas específicos, onde convivem mamíferos hospedeiros e flebotomíneos transmissores do parasito, possibilitando os diversos ciclos de transmissão (GRIMALDI *et al.*, 1989).

Nas Américas, a doença é encontrada desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, não ocorrendo no Chile e no Uruguai, e está associada à colonização agrária, construção de estradas, garimpo, mineração, extração de madeira e outras atividades extrativistas. Os indígenas habitantes de regiões endêmicas, militares em treinamento nas selvas e expedições turísticas em áreas florestais são também acometidos (GRIMALDI *et al.*, 1989; FALQUETO & FERREIRA, 2005).

No Brasil, as leishmanioses são amplamente distribuídas territorialmente, acometendo o homem em prevalências diferentes de acordo com as regiões geográficas do país. Independente das medidas de controle implementadas, o número de casos registrados vem aumentando progressivamente, chegando a 450.000 casos novos entre os anos de 1980 e 2000. A doença ocorre em todos os estados, com maior concentração nas regiões norte e nordeste, tendo sido observado aumento de casos também na região sul do país (FUNASA, 2002).

Em todo o Novo Mundo, a transmissão da LTA ocorre em dois ciclos distintos: silvestre e peri-urbano. Antes associada apenas com áreas florestais, a transmissão está cada vez mais adaptada ao ambiente peridomiciliar devido ao fato do homem adentrar áreas preservadas para a construção de suas residências. Na cadeia epidemiológica clássica, o ciclo do parasito é mantido entre flebotomíneos e animais silvestres, sendo o homem considerado um hospedeiro acidental, que se infecta quando penetra na mata, em geral para exercer atividade relacionada ao trabalho. O entendimento da epidemiologia da doença tem caracterizado um aspecto predominantemente endêmico, especialmente em áreas de colonização onde florestas primárias foram substituídas por matas remanescentes ou residuais. Quando o homem

fixa residência nestes arredores ou nas encostas das serras, mantém o hábito de circular pela floresta adjacente. A adaptação do flebotomíneo ao ambiente peridomiciliar ou mesmo domiciliar propicia a transmissão de *Leishmania* a animais domésticos, com a possibilidade de atuarem como reservatórios ou amplificadores da transmissão da infecção ao homem, fazendo com que a probabilidade de contaminação seja semelhante ao observado na população sob risco. Este tipo de cadeia epidemiológica ocorre em áreas endêmicas nos estados do Sudeste, Paraná (Vale do Ribeira), além de amplas áreas na região nordeste do país. Nesses locais, embora sejam mantidas as características de endemicidade da doença, as populações sob risco são atingidas por surtos, muitas vezes de proporções limitadas, ou casos esporádicos com características de sazonalidade (GRIMALDI et al., 1989; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; CASTRO, 2001).

A situação se agrava se considerarmos o potencial patogênico do parasito, características biológicas de distintas espécies do flebotomíneo, com efeito na transmissão de *Leishmania*, além das dificuldades operacionais na eliminação dos insetos transmissores e a precariedade dos serviços de saúde (TALHARI et al., 1988). O complicador maior é a diversidade de espécies. São conhecidas cerca de 700 espécies de flebotomídeos, das quais 400 ocorrem no continente americano; no Estado de São Paulo são conhecidas 60, mas nem todas são vetores das diferentes espécies de *Leishmania*. Quando seu habitat é destruído, o mosquito adapta-se facilmente ao ambiente domiciliar. A disseminação dos parasitos acontece em áreas focais porque os insetos voam silenciosamente em saltos, em vôos curtos até poucas centenas de metros do local onde se alimentaram e foram contaminados. Na região norte do Paraná, estudos demonstraram que *Lutzomyia whitmani* é a espécie predominante de flebotomíneo, sendo caracterizada a infecção por *L. (V.) braziliensis* nestes insetos, o que confirma seu papel de vetor da doença (LUZ et al., 2000). Além disso, o número de casos de leishmaniose registrados no Paraná recentemente é bastante elevado (THOMAZ-SOCCOL et al., 2003; CASTRO et al., 2005).

Outro fator de complicação para o estudo da doença se refere ao fato de ela possuir uma epidemiologia diferenciada em cada região do estado. No Vale do Ribeira, a doença é conhecida desde o início do século XX. Já na região norte do estado, os

primeiros casos vieram com a colonização, nos anos 40 e 50 do século XX. Nas duas regiões endêmicas, há diferença de espécie vetora, sendo *Lu. intermedia* freqüente na região do Vale do Ribeira e *Lu. whitmani* na região norte do Estado (CASTRO *et al.*, 2002 e 2005).

3.7 DIAGNÓSTICO DA LTA

O diagnóstico de leishmaniose abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Frequentemente, a associação de alguns desses elementos é essencial para se chegar ao diagnóstico final. Apesar de todos os avanços ocorridos na última década, incluindo as metodologias de biologia molecular, ainda não foi estabelecida uma forma de diagnóstico absoluta e precisa para todos os casos clínicos de leishmaniose.

Boa parte dos métodos clássicos de diagnóstico possui limitações significativas, incluindo baixa sensibilidade em função da escassez de parasitas, reações cruzadas com outros tripanosomatídeos, problemas quanto à capacidade imune do paciente, demora excessiva para a obtenção de resultados e o acesso restrito dos pacientes das regiões endêmicas aos serviços de saúde que disponham de estrutura tecnológica adequada. Dessa forma, novos métodos de diagnóstico vêm sendo propostos nas últimas décadas. Anticorpos monoclonais (McMAHON-PRATT *et al.*, 1982) e isoenzimas (RIOUX *et al.*, 1990; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993;) parecem ser os que atingiram maior prestígio, apesar destes métodos exigirem grande quantidade de parasitos. Para suprimir esse problema, novas técnicas de elevada sensibilidade baseadas no DNA foram padronizadas (PEREIRA, 2005).

3.7.1 Diagnóstico clínico e epidemiológico

O diagnóstico clínico da LTA pode ser feito com base na característica da lesão que o paciente apresenta, associado à anamnese, tendo os dados epidemiológicos

grande importância, especialmente se o paciente procede de área endêmica ou esteve em contato com as florestas de zonas leishmanióticas. Nas formas típicas, nas quais a lesão está evidente e a história clínica é exuberante, o diagnóstico clínico pode ser feito sem dificuldade. Contudo, deve ser feito o diagnóstico diferencial de outras dermatoses granulomatosas que apresentam lesões semelhantes à LTA. As ulcerações cutâneas devem ser distinguidas das úlceras tropicais fusoespiroquetárias, que geralmente se localizam na parte inferior das pernas, onde costumam ser extensas, de limites irregulares, muito supurativas, fétidas e dolorosas. As formas verrucosas e vegetantes devem ser diferenciadas de lesões semelhantes produzidas pela boubá, pela blastomicose, histoplasmose e pela esporotricose, entre outras. O diagnóstico diferencial cabe também para o impetigo, a sífilis, a lepra, a tuberculose cutânea e outros quadros semelhantes (REED, 1996; OLIVEIRA-NETO, 1998; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

3.7.2 Diagnóstico laboratorial

3.7.2.1 Diagnóstico parasitológico – pesquisa do parasito

A demonstração do parasito para o diagnóstico da LTA pode ser feito do material obtido das lesões, por meio de exame direto do esfregaço por aposição, exame histopatológico, culturas e inóculo em animais. O fragmento de tecido deve ser retirado da borda da lesão, com auxílio de *punch* ou bisturi. Para uma amostragem adequada, é necessário que este fragmento contenha regiões diferentes da lesão em extensão (úlceras, borda e pele adjacente) e profundidade (derme e epiderme), permitindo boa avaliação histopatológica e a utilização do fragmento para outros procedimentos. Nas lesões mucosas, o fragmento deve ser retirado das áreas infiltradas (BERMAN, 1997).

3.7.2.1.1 Esfregaço por aposição e histopatológico

O exame mais simples, e por essa razão geralmente o primeiro a ser realizado, é

a procura direta da forma amastigota em material obtido da lesão por escarificação, aspiração ou biópsia da borda. No esfregaço em lâminas coradas com Giemsa ou Leishman e no exame histopatológico corado por hematoxilina-eosina, a visualização das formas amastigotas, nos casos de infecção recente por *L. braziliensis*, está em torno de 100% nos dois primeiros meses de evolução, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses. Em geral, a porcentagem de positividade usando o método de demonstração direta do parasito é inversamente proporcional à duração da infecção, sendo que em lesões recentes, os amastigotas podem ser encontrados com maior facilidade. No entanto, em lesões crônicas, as amastigotas são escassas, requerendo maior dedicação do microscopista, o que também ocorre em casos de lesões cutaneomucosas (FURTADO, 1994).

No exame histopatológico, o fragmento de pele obtido pela biópsia é submetido a técnicas histológicas de rotina, com coloração hematoxilina-eosina. O encontro de amastigotas ou de um infiltrado inflamatório característico e compatível com a evolução da infecção, pode definir ou sugerir o diagnóstico. A pesquisa visual de amastigotas nesses exames é dificultada pelo tamanho reduzido das amastigotas, associado à escassez parasitária nos casos gerados por espécies do subgênero *Viannia*. O achado das formas amastigotas, que resultaria num resultado conclusivo, é mais difícil nos exames histopatológicos do que nos esfregaços por aposição, uma vez que os fixadores tendem a induzir uma retração tecidual, reduzindo ainda mais o tamanho do parasito (CUBA, 2000). A pesquisa do parasito nestas metodologias exige um microscopista experimentado e persistente, pois a chance de se encontrar o parasito é diretamente proporcional ao tempo dedicado ao exame da lâmina (CASTILLO & ROJAS, 1997).

No aspecto histológico, considerado para sugerir o diagnóstico na impossibilidade de identificação das formas amastigotas, os casos cutâneos apresentam um infiltrado fugaz de polimorfonucleares neutrófilos que é substituído pelo infiltrado histiolinfoplasmocitário característico (reação exsudativa celular), como primeira reação frente à presença do parasito nos tecidos. Os parasitos, quando presentes, são encontrados em vacúolos intracitoplasmáticos dos macrófagos ou nos espaços intercelulares, geralmente isolados. Com a evolução da lesão e o aumento do

nível de anticorpos circulantes e nos tecidos, ocorrem fenômenos necróticos no infiltrado celular, podendo apresentar vasculite (reação exsudativa e necrótica). Em seguida, as áreas de necrose são rodeadas por macrófagos ativados e células gigantes, quando ocorre a diminuição da carga parasitária determinada pela necrose (reação exsudativa e necrótico-granulomatosa). A resposta tissular volta ao ponto inicial com a presença exclusiva do infiltrado histiolinfoplasmocitário enquanto houver sinais de agressão tissular. Com a involução espontânea ou sob terapêutica, o infiltrado celular nos tecidos começa a diminuir, persistindo por algum tempo após o fechamento da lesão, participando do clareamento dos resíduos pós-inflamatórios e na recomposição dos tecidos (MAGALHÃES *et al.*, 1982, 1986).

As formas mucosas apresentam uma reação inflamatória crônica, que se estende da zona papilar à reticular, constituída por um infiltrado dérmico de linfócitos, histiócitos e plasmócitos (reação exsudativa celular). Também são observados granulomas associados à necrose tissular. A degeneração fibrinóide do colágeno e a vasculite são achados comuns que, na ausência de amastigotas, sugerem o diagnóstico para esta patologia (MAGALHÃES *et al.*, 1982, 1986).

Os casos da forma clínica cutâneo-difusa têm como característica histopatológica a presença de um granuloma constituído por macrófagos vacuolizados, densamente parasitados (reação exsudativa mononuclear). Nos casos da forma hiperérgica, ocorre nos tecidos um granuloma do tipo tuberculóide (reação exsudativa tuberculóide). Nestes casos geralmente encontra-se grande quantidade de parasitos.

Apesar da baixa sensibilidade, o exame histopatológico pode ser útil no diagnóstico diferencial, pois permite eliminar várias outras patologias, dentre elas neoplasias e paracoccidiodomicose, que são comumente confundidas com leishmaniose, e fornece dados que, associados ao quadro clínico e epidemiológico, podem sugerir o diagnóstico de leishmaniose (MAGALHÃES *et al.*, 1982, 1986).

3.7.2.1.2 Cultura

Das metodologias utilizadas para o diagnóstico parasitológico, a cultura é o

método que geralmente apresenta os maiores índices de positividade, em torno de 50 a 80% dos casos, dependendo das condições de obtenção do fragmento e do manuseio no cultivo (WEIGLE *et al.*, 1987). A positividade aumenta quando são observados os cuidados técnicos na coleta, incluindo a desinfecção prévia da lesão, acondicionamento do fragmento em salina com antibiótico, transporte sob refrigeração e processamento do material em condições assépticas. Essas medidas diminuem a ocorrência de contaminação, que dificultam o crescimento da *Leishmania* e a possibilidade de isolamento (WEIGLE *et al.*, 1987; CUBA, 2000).

A cultura pode ser feita a partir de fragmentos do tecido ou de aspirados dos bordos da lesão ou de linfonodos infartados. As formas promastigotas crescem relativamente bem em diversos meios de cultura à temperatura ambiente (24-26°C). Os meios mais empregados para isolamento são o ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle – NNN, e o de Tobie – Evans, pois aumentam a probabilidade de isolamento do parasito. Nas culturas axênicas, o crescimento do parasita ocorre em cerca de sete a dez dias, devendo ser mantida por repiques sucessivos, com intervalos de cinco a dez dias entre um e outro (WEIGLE *et al.*, 1987; CUBA, 2000).

3.7.2.1.3 Inoculação em animais

Outra forma de diagnóstico parasitológico direto é a inoculação em animais suscetíveis, dos quais o *hamster* e o camundongo têm sido os mais utilizados. O método consiste em inocular no focinho ou nas patas posteriores, via intradérmica, um triturado com soro fisiológico de fragmento da lesão suspeita. Esse método de isolamento, infelizmente, além do longo tempo necessário para a evolução da lesão no modelo animal (2 a 9 meses, em média), tem sua eficácia submetida à grande variação, conforme a espécie de *Leishmania*, especialmente do subgênero *Viannia* (FURTADO, 1994; CUBA, 2000).

3.7.2.2 Diagnóstico molecular

A necessidade de tecnologias com maior sensibilidade para o diagnóstico da LTA tem direcionado os estudos para metodologias baseadas na pesquisa do DNA ou RNA do parasito. A partir da década de 80, cada vez mais são aplicados métodos moleculares para a detecção e identificação precisa dos parasitos do gênero *Leishmania*, sem necessidade de isolamento do parasita em cultura. De uma forma geral, assume-se que a detecção de DNA de *Leishmania* resulta da presença do parasito vivo no tecido, indicando, desta forma, infecção ativa (PIÑERO *et al.*, 1999). Métodos de hibridização com sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa (RT-PCR) para detecção de RNA e a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de DNA, estão disponíveis para identificação do parasito (SCHALLING & OSKAN, 2002). A detecção de parasitos pela PCR é superior aos métodos parasitológicos convencionais, podendo alcançar uma sensibilidade de 97% na leishmaniose cutânea e 71% na leishmaniose mucosa causadas por *L. braziliensis* (PIRMEZ *et al.*, 1999; PEREIRA, 2005). A PCR tem se mostrado como uma nova opção, principalmente em função de sua grande sensibilidade, sendo particularmente útil nos casos em que a quantidade de parasitas nas lesões é escassa. Essa metodologia tem sido a mais bem-sucedida técnica molecular utilizada para o diagnóstico, inclusive permitindo diferenciar espécies do agente etiológico, além de apresentar especificidade, sensibilidade e versatilidade superiores aos métodos convencionais (SINGH & SIVAKUMAR, 2003; TAVARES *et al.*, 2003). O cinetoplasto, organela exclusiva dos kinetoplastida, contém aproximadamente 10.000 fragmentos circulares de DNA (minicírculos de DNA do cinetoplasto – kDNA), com peso molecular entre 600 e 800 pb para espécies do gênero *Leishmania*. A singularidade dessas moléculas tem chamado a atenção das técnicas moleculares de diagnóstico como a PCR, que vem mostrando bons resultados no uso do kDNA de *Leishmania* (RODRIGUES *et al.*, 2002). Outra técnica molecular muito utilizada é a RAPD, que foi desenvolvida por Williams *et al.* (1990) e Welsh & McClelland (1990) e utilizada para identificação de espécie, diferenciação e variabilidade genética intra-específica, epidemiologia molecular e evolução genética dos

protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (BAÑULS *et al.*, 1999; PEREIRA, 2005).

3.7.2.3 Diagnóstico sorológico – imunofluorescência indireta e enzimaímunoensaio

Entre os métodos sorológicos para o diagnóstico da LTA, a imunofluorescência indireta (IFI) e enzimaímunoensaio (ELISA) são rotineiramente os mais utilizados. As técnicas são baseadas na utilização de antígenos de *Leishmania*, fixados em fase sólida, submetidos à reação sorológica com amostras suspeitas e anticorpos conjugados, marcados com substâncias fluorescentes ou enzimas, que permitem a detecção, titulação e quantificação de pequenas quantidades de anticorpos específicos nas amostras avaliadas (THIERRY *et al.*, 1991).

As reações positivas podem auxiliar no diagnóstico, desde que excluídas as possibilidades de reação cruzada. Considerando que as metodologias não são espécie-específicas, ocorrem reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, dificultando o seu uso em áreas endêmicas onde ocorrem casos de doença de Chagas e leishmaniose visceral (calazar) (FURTADO, 1980). A sensibilidade dos testes sorológicos é relativamente alta, variando nos estudos realizados de 50 a 70%, apesar de resultados negativos não excluírem o diagnóstico de leishmaniose (KALIPADA, 1995). Os títulos de anticorpos são normalmente baixos em casos com lesão cutânea recente, mas podem estar aumentados nas formas crônicas da doença, especialmente em casos de envolvimento mucoso. A utilização de IFI e ELISA tem se mostrado útil no acompanhamento da evolução terapêutica e no controle de cura, sendo observados a gradual diminuição e o desaparecimento dos títulos sorológicos (CHIARI *et al.*, 1973; KALIPADA, 1995).

3.7.2.4 Avaliação da resposta celular – intradermorreação de Montenegro

A intradermorreação de Montenegro (IDRM) é uma reação de hipersensibilidade

tardia, que consiste na aplicação de 0,1 mL de antígeno de *Leishmania* intradermicamente na face anterior do antebraço. Embora existam diferentes preparados disponíveis, todos utilizam proteínas extraídas de formas promastigotas. No caso de reações positivas, verifica-se o estabelecimento de uma reação inflamatória local formando um nódulo ou pápula, com diâmetro igual ou superior a 5 mm, que atinge o auge em 48-72 horas, regredindo a partir daquele período. A sensibilidade e a especificidade do método variam de 80 a 100% (FURTADO, 1980), dependendo da quantidade de proteína e da espécie de *Leishmania* utilizada no preparado e da forma de preservação dos antígenos (AKUFFO *et al.*, 1995). O teste pode ser negativo em casos de lesões ativas com tempo de evolução inferior a trinta dias e na leishmaniose cutânea-difusa (MELO *et al.*, 1977; SOUZA *et al.*, 1992; FUNASA, 2000).

A IDRM avalia a presença de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania*, portanto não avalia se o indivíduo apresenta uma infecção recente ou passada, ou qual a espécie causadora da infecção (MELO *et al.*, 1977).

3.8 METODOLOGIAS DE IMUNOCITOQUÍMICA (ICQ)/IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

3.8.1 Fundamentos e histórico

Imunocitoquímica e imunohistoquímica são definidas como metodologias que utilizam anticorpos para localizar e identificar estruturas teciduais, que funcionam como antígenos, *in situ*. Essas técnicas consistem em um conjunto de reações específicas, baseadas na interação antígeno-anticorpo, que ao final do processo conferem cor ou eletrodensidade à estrutura em estudo. Essa metodologia permite a conjugação de um marcador a um anticorpo, outra proteína ou composto, sem causar dano à ligação estabelecida entre o antígeno e o anticorpo, possibilitando a observação microscópica dos locais ocupados pelos anticorpos e conseqüentemente pelo antígeno, seja ele um componente celular normal ou patogênico (STERNBERGER, 1986).

A primeira técnica de ICQ foi introduzida por Coons *et al.* (1941) e compreendia a conjugação de um anticorpo com um corante fluorescente, com sua utilização na

identificação de antígenos em cortes histológicos. O primeiro composto a ser conjugado com um anticorpo foi o isocianato de fluoresceína, sendo substituído posteriormente pelo isotiocianato de fluoresceína e por outros compostos com maior facilidade de conjugação, como as enzimas peroxidase, fosfatase alcalina e glicose oxidase.

Os métodos de conjugação são classificados como diretos e indiretos, podendo estes últimos ser utilizados como indireto simples ou com compostos conjugados, como o PAP (peroxidase antiperoxidase), APAAP (fosfatase alcalina antifosfatase alcalina), avidina-biotina, espreptavidina-biotina e LSAB (*labeled streptavidin-biotin*), polímero direto (EPOS®) e polímero indireto (*Envision®* e *Picture®*) (POLAK & NOORDEN, 1984; BORGES-FERRO, 2005).

3.8.2 Pré-requisitos técnicos para as metodologias de ICQ e IHQ

A aplicação das metodologias de ICQ e IHQ deve observar determinados requisitos técnicos necessários à obtenção dos melhores resultados.

A primeira condição a ser observada é que o antígeno, no decorrer do processo, deve permanecer insolúvel e disponível no tecido em estudo. Esta insolubilidade implica em sua permanência no sítio original, bem como na preservação das características antigênicas originais. Em alguns casos, é necessária a aplicação de métodos de recuperação antigênica das amostras (BORGES-FERRO, 2005).

A segunda condição necessária é a especificidade do anticorpo primário, ou seja, sua capacidade de ligar-se especificamente ao antígeno pesquisado, restringindo-se ao máximo as ligações inespecíficas de fundo (*background*). Essa especificidade depende do terceiro pré-requisito, que é caracterizado pelo conhecimento do soro ou anticorpo primário utilizado. Características como clonalidade, classes e subclasses de imunoglobulinas, especificidade, reatividade, condições de manuseio e estabilidade revelam-se essenciais para a interpretação dos resultados bem como para avaliação da qualidade da técnica desenvolvida. A quarta condição essencial para as metodologias de ICQ e IHQ refere-se ao uso de um marcador (conjugado e cromógeno) com estabilidade e intensidade suficiente para sua observação e correta identificação, não

permitindo dúvidas sobre a presença do antígeno no material em estudo (POLAK & NOORDEN, 1984; BARRET, 1988; BORGES-FERRO, 2005).

3.8.3 Características e aplicações da avidina-biotina

Os métodos de avidina-biotina são utilizados desde 1940, em cromatografia bioquímicas que se baseavam em sua grande afinidade. A avidina é uma proteína de caráter básico, com peso molecular de 67 KD, presente na clara de ovo em grandes quantidades. É constituída por quatro subunidades, que por sua vez apresentam uma cadeia polipeptídica com seqüência de 128 aminoácidos cada. A principal característica da estrutura terciária desta molécula é a formação de quatro sítios, cada um correspondendo a uma das referidas subunidades, que tem a capacidade de ligar-se às moléculas de biotina. As metodologias de avidina-biotina baseiam-se nos seguintes princípios:

- afinidade entre avidina e biotina, que ao se ligarem formam um complexo praticamente indissociável;
- possibilidade de ligação da biotina com outras moléculas (enzimas e anticorpos), formando compostos biotínilados;
- possibilidade de marcação da avidina com enzimas, metais pesados e fluorocromos;
- possibilidade de utilização da avidina para ligação (ponte) entre dois compostos biotínilados.

Apesar de suas características úteis, a avidina apresenta a desvantagem de possuir resíduos oligossacarídeos em sua estrutura, induzindo sua ligação a estruturas teciduais de carga elétrica negativa, provocando o aparecimento de coloração inespecífica de fundo. A solução para esta limitação técnica ocorreu com o surgimento da estreptavidina, uma proteína com peso molecular de 60 KD, obtida a partir de culturas de *Streptomyces avidinii*, que não apresenta resíduos oligossacarídicos e tem as demais características favoráveis da avidina (HSU *et al.*, 1981; BORGES-FERRO, 2005).

A biotina, também conhecida como vitamina H, é uma proteína de 244 dáltons,

encontrada em grande quantidade na gema do ovo. Sua simplicidade estrutural e seu tamanho reduzido permitem sua ligação com facilidade aos quatro sítios específicos da avidina e estreptavidina. A ligação química específica entre as duas moléculas ocorre de forma não-covalente, com elevada velocidade cinética e grande estabilidade, podendo ser desfeita somente em situações extremas de acidez, com pH abaixo de 1,5 (HSU *et al.*, 1981; BORGES-FERRO, 2005).

O processo pelo qual a biotina é conjugada às moléculas de enzimas, ácidos nucléicos e anticorpos é denominado biotinição. O tamanho reduzido da biotina permite sua ligação a outras estruturas, sem que ocorra alteração de suas características imunológicas e físico-químicas, podendo inclusive ser realizada a múltipla biotinição com o revestimento de anticorpos com até 150 moléculas de biotina. Este processo utiliza as moléculas de biotina em sua forma ativada, permitindo a ligação de seus grupos carboxílicos aos terminais NH_2 dos anticorpos ou outras moléculas de interesse (HSU *et al.*, 1981; BORGES-FERRO, 2005).

A avidina pode ser marcada por diversas moléculas, como os fluorocromos rodamina e fluoresceína, enzimas peroxidase, fosfatase alcalina e beta-galactosidase, ferritina e ouro coloidal. No caso dos fluorocromos, pode ocorrer a ligação via um derivado do isotiocianato, para as enzimas e ferritina é utilizado um reagente de braço duplo, como o glutaraldeído, e o ouro coloidal pode ser ligado por forças eletrostáticas não-covalentes (HSU *et al.*, 1981; POLAK & NOORDEN, 1986; STERNBERGER, 1986; BORGES-FERRO, 2005).

3.8.4 Métodos imunocitoquímicos de avidina-biotina

Os métodos que utilizam a avidina-biotina não diferem essencialmente dos demais métodos de diagnóstico imunocitológico, não necessitando a utilização de processamento ou fixação especial, podendo ser aplicados na rotina diagnóstica de serviços laboratoriais. Os métodos mais comumente utilizados são o LAB (*Labelled avidin-biotin*), LSAB (*Labelled streptavidin-biotin*) e ABC (*Avidin-biotin complex*). O método apresenta elevada sensibilidade, proporcionada pela ampliação do sinal devido

á biotinação do anticorpo secundário com até 150 moléculas de biotina, aumento na qualidade da marcação em casos de fixação prolongada ou processamento deficiente, diminuição no tempo de processamento e custos da técnica e diminuição das colorações inespecíficas de fundo (HSU *et al.*, 1981;BOENISCH, 2001; BORGES-FERRO, 2005).

3.8.5 ICQ e IHQ aplicadas no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana

O desenvolvimento das metodologias de ICQ/IHQ tem sido acompanhado pela avaliação de diferentes anticorpos, tanto policlonais como monoclonais. Desde 1993, a OMS tem testado um conjunto de anticorpos monoclonais contra a maioria das espécies de *Leishmania*, totalizando aproximadamente 70 espécies (GRIMALDI & McMAHON-PRATT, 1996). Um anticorpo monoclonal denominado G2D10 reconheceu todas as espécies de *Leishmania* testadas, bem como parasitas pertencentes à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida (KENNER *et al.*, 1999). Considerando prioritariamente o diagnóstico da doença, a utilização de anticorpos policlonais atende aos requisitos técnicos de sensibilidade e especificidade necessários para sua aplicação em ICQ/IHQ, sendo mais acessível que os monoclonais, tanto no aspecto de custo financeiro quanto na disponibilidade de estrutura técnica de produção. Estas características têm permitido a aplicação dos anticorpos policlonais em ICQ/IHQ para a identificação, com sucesso, de amastigotas íntegras e antígenos de *Leishmania* em diferentes tecidos humanos e animais (SCHUBACH *et al.*, 2001; TAFURI, 2004).

A metodologia de IHQ tem apresentado sensibilidade de 59 a 95%, dependendo do parâmetro considerado. Para o padrão amastigota, que implica na visualização do parasita íntegro, a sensibilidade é menor. A especificidade da metodologia utilizando anticorpos policlonais é de 95 a 100%, considerando parasitas pertencentes à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida.

Nesta perspectiva, o desenvolvimento de metodologias de ICQ/IHQ que colaborem para o estabelecimento de um diagnóstico correto e seguro da LTA, permitirá a identificação de áreas prioritárias para ações de prevenção, tratamento e

controle. O sistema a ser desenvolvido deve ser de fácil execução e interpretação, sem a necessidade de equipamentos adicionais, podendo ser utilizado em locais que não disponham de estrutura técnica laboratorial sofisticada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS SOLÚVEL E INSOLÚVEL

Formas promastigotas das cepas de referência MHOM/BR/75/M2903 de *L. (V.) braziliensis* e MHOM/BR/78/PH8 de *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas separadamente em meios bifásicos de Tobie – Evans a 24°C, por períodos sucessivos de sete dias, sendo transferidas de tubos (15 mL) para erlenmeyer (250 mL) e garrafas de Roux (1000 mL). Após a fase exponencial de crescimento, o sobrenadante contendo os parasitos foi recolhido de suas respectivas culturas e o material filtrado em gaze e centrifugado a 3500 rpm a 4°C. O sedimento de parasitos foi lavado com soro fisiológico a 0,9% e 0,3% sucessivamente, para lise das hemácias e remoção da hemoglobina de coelho proveniente do meio de cultura e residual no sobrenadante. Os parasitos obtidos foram lavados por suspensão e centrifugação com tampão PBS pH 7,2.

O material foi submetido por cinco vezes a processo de congelamento a – 80°C (nitrogênio líquido) e descongelamento imediato a 37°C. Após esta etapa, o material foi submetido ao tratamento com ultra-som (5 séries de 30 segundos – 80 ciclos por minuto), para rompimento da estrutura celular, controlado por microscopia ótica. Todas as etapas foram realizadas em banho de gelo.

Os antígenos obtidos foram centrifugados a 15000 rpm a 4°C por 60 minutos para recuperação, no sobrenadante, do antígeno solúvel e no sedimento para o antígeno insolúvel, contendo membrana, cinetoplasto e flagelo.

A concentração de proteínas do antígeno solúvel contida no sobrenadante foi determinada em triplicata pelo método de Bradford (1976). No antígeno insolúvel, por se tratar de material particulado, a determinação de proteínas foi realizada em sextuplicatas, por dosagem de nitrogênio total – método de micro Kjeldahl (A.O.A.C., 960.52, 1995 – modificado) e conversão em proteínas aplicando o fator de multiplicação 6,25. Ambos os antígenos foram aliquotados e armazenados a – 20°C até sua utilização.

4.2 OBTENÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES

Para obtenção de soros hiperimunes (HPI), foram utilizados dois coelhos da raça Nova Zelândia albinos para cada antígeno de *L. (V.) braziliensis* (solúvel e insolúvel) e *L. (L.) amazonensis* (solúvel e insolúvel). Os animais foram inoculados na região dorsal, via subcutânea, com doses de 1,0 mg de proteína, sendo que ao final do ciclo de imunização cada animal recebeu 3,0 mg de proteína de cada antígeno. A primeira dose foi constituída de uma emulsão com volumes iguais de solução antigênica e adjuvante de Freud completo, num volume de 3 mL. Após 30 dias, foi inoculado a segunda dose, com volumes iguais de solução antigênica e adjuvante de Freud incompleto. Contados 45 dias do início do ciclo de imunização, os animais receberam a terceira dose com composição idêntica à segunda. Foram coletadas amostras sanguíneas dos animais inoculados e do controle aos 0, 15, 30, 45 e 55 dias para acompanhamento da cinética de produção de anticorpos. Sangrias de produção foram efetuadas com 60 e 65 dias após a primeira inoculação, com a finalidade de obter maior volume de soro.

A titulação de anticorpos foi realizada utilizando-se as técnicas de ELISA (item 4.3) e os soros hiperimunes foram armazenados a -20°C até processamento e purificação. Também foram armazenadas (-20°C) alíquotas em tampão PBS 0,05 M, pH 7,4 e em solução contendo glicerol a 10%, para posterior avaliação.

4.3 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania*

O controle da cinética de produção de anticorpos, pelos animais imunizados, bem como a detecção de anticorpos específicos nos soros hiperimunes e imunoglobulinas purificadas, foram realizados utilizando-se a metodologia de enzimaímunoensaio (ELISA) (ENGVALL, 1972) em microplacas de poliestireno. Na padronização da técnica foram estabelecidas as concentrações do antígeno solúvel por cavidade (sensibilização da placa), do substrato e do cromógeno, além das diluições de amostras (soros hiperimunes e IgG) e conjugados.

Os antígenos solúveis utilizados foram diluídos em "coating buffer" na

concentração de 250 ng/cavidade e fixados nas placas mantidas "overnight" a 4°C. Na seqüência, as placas foram lavadas, com solução de lavagem (soro fisiológico 0,9% com 0,5% de Tween 20) e secas por inversão em papel toalha e bloqueadas com solução de caseína a 2% por incubação a 37°C, uma hora. Após o bloqueio, novo procedimento de lavagem e secagem foi realizado. Na seqüência, foram adicionados 100 µl/cavidade das amostras e controles, diluídos em tampão de incubação e mantidos a 37°C por uma hora. As amostras de soro e imunoglobulinas foram testadas nas diluições de 1/100 e 1/200. Foi realizada nova lavagem e secagem e acrescentado 100 µl/cavidade do conjugado enzimático anti-IgG de coelho peroxidase (Sigma A-6154), diluído 1/1000 em tampão de incubação. Após incubação a 37°C por uma hora, com nova lavagem e secagem, o cromógeno (peróxido de hidrogênio) e o substrato (OPD-orto-fenileno diamino), diluídos em tampão citrato, foram adicionados em volume de 100 µL/cavidade e incubados em temperatura ambiente, na ausência de luz, por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL/cavidade de solução de ácido sulfúrico a 5% e as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro para leitura de placas em 492 nm.

4.4 TRATAMENTO DOS SOROS HIPERIMUNES – EXTRAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS (IgG)

As frações IgG dos soros hiperimunes (HPI) (Ag solúvel e Ag insolúvel de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*) foram extraídas utilizando-se o protocolo modificado da *Amersham Biosciences – Antibody Purification Handbook*, 2002, empregando a metodologia de McKinney & Parkinson, 1987. Aliquotas de 20 mL de cada soro hiperimune foram descongeladas e tratadas com adição lenta de 30 mL de solução saturada de sulfato de amônio a 4°C. As soluções foram mantidas sob refrigeração e leve agitação por 18 horas, sendo em seguida centrifugadas a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram desprezados e os precipitados contendo as frações de imunoglobulinas foram dissolvidos em 20 mL de tampão PBS 0,05 M, pH 7,4.

As soluções obtidas foram dialisadas separadamente com membranas de celulose em tampão PBS 0,05 M, pH 7,4, para remoção do sulfato de amônio. Este procedimento foi realizado a 4°C, sob leve agitação, durante 48 horas, em frascos erlenmeyer de 1 litro. O tampão PBS foi substituído a cada hora durante as três primeiras horas e posteriormente a cada 12 horas, totalizando 7 litros para cada solução dialisada.

Após a diálise, foi determinada a concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976) e a atividade das imunoglobulinas pelo método de enzimaensaio (item 4.3). As soluções contendo as imunoglobulinas extraídas com sulfato de amônio (IgG - SA) contra os antígenos solúvel e insolúvel de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* foram fracionadas em alíquotas e congeladas a - 20°C, em tampão PBS 0,05 M, pH 7,4 e em solução contendo glicerol a 10%, para posterior avaliação e purificação.

4.5 PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS – ANTICORPOS POLICLONAIS

As frações de imunoglobulinas (IgG - SA) congeladas em solução tampão PBS 0,05 M, pH 7,4 e em solução contendo glicerol a 10% foram submetidas a processo de purificação cromatográfico em coluna, utilizando-se resina de G – sepharose (Sephadex® G-50).

Soluções contendo 4 mL de cada fração IgG - SA com igual volume de tampão TRIS 100 mM, pH 7,0, foram submetidas à filtração (filtro 0,4 – 0,8 µm) e incubadas 12 horas (*over night*) a 4°C, em colunas contendo G – sepharose pré-equilibrada com tampão TRIS 50 mM, pH 7,0. As colunas contendo a resina foram lavadas com 100 mL de tampão TRIS 50 mM, pH 7,0 e as IgG purificadas (IgG - SX) foram eluídas com solução de glicina 0,1 M, pH 2,5 e coletadas frações de 1 mL em tubos contendo 100 µL de tampão TRIS 1 M, pH 9,0, para neutralização do pH e preservação das imunoglobulinas.

A concentração de IgG - SX contida nas frações coletadas foi estimada por espectrofotometria (BROWN, 1980), com leitura de absorbância a 280 nm (A_{280}). Em seguida, foi feito um *pool* das frações de IgG - SX, contendo concentração superior a

1,0 mg/mL de proteínas, que foi dialisado em tampão PBS 0,05 M, pH 7,4 durante 3 horas, com substituição do tampão a cada hora. Cada *pool* das frações de IgG - SX foi submetido à avaliação de sua atividade pelo método de enzimaímunoenensaio, alíquotado e congelado a - 20°C em tampão PBS 0,05 M, pH 7,4 e em solução contendo glicerol a 10%.

4.6 CULTIVO DOS PROTOZOÁRIOS PARA PREPARO DE LÂMINAS

4.6.1 Cultura *in vitro*

Formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* foram cultivadas em meio de Tobie – Evans, a 24 °C, por períodos sucessivos de sete dias. O material obtido em cultura foi utilizado na confecção de lâminas para avaliação de parâmetros de fixação e conservação de amostras, além de especificidade e reatividade dos soros hiperimunes (HPI) e anticorpos policlonais (IgG - SA e IgG - SX) desenvolvidos.

4.6.2 Inoculação experimental

Camundongos Balb-c machos e hamsters machos jovens foram inoculados nas patas traseiras com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, respectivamente, contidas em suspensões de soro fisiológico a 0,9%, na concentração mínima de 10^4 parasitas / mL. As lesões apresentadas, ricas em formas amastigotas (Figuras 4, 5 e 6), foram biopsiadas para confecção de lâminas por aposição ou conservadas em formol tamponado para posterior processamento histológico convencional e avaliação dos parâmetros descritos no item 4.6.1.

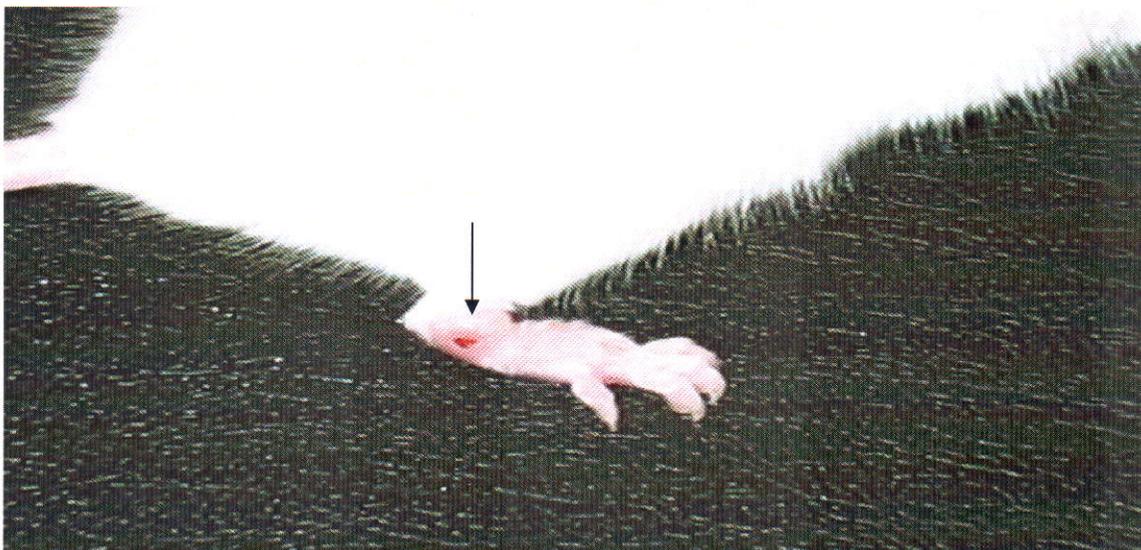


FIGURA 4 – LESÃO EM PATA POSTERIOR DE CAMUNDONGO BALB-C 21 DIAS APÓS INOCULAÇÃO DE *L. (L.) amazonensis*



FIGURA 5 – LESÃO EM PATA POSTERIOR DE CAMUNDONGO BALB-C 21 DIAS APÓS INOCULAÇÃO DE *L. (L.) amazonensis*



FIGURA 6 – LESÃO EM PATA POSTERIOR DE HAMSTER 60 DIAS APÓS INOCULAÇÃO DE *L. (V.) braziliensis*

4.7 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FIXAÇÃO DE PARASITOS E CONSERVAÇÃO DAS LÂMINAS PARA IMUNOCITOQUÍMICA

Preliminarmente ao desenvolvimento da metodologia de ICQ foram avaliados e estabelecidos parâmetros de fixação e conservação das amostras em lâminas, utilizando-se material de cultura *in vitro* e infecções experimentais. Foram avaliadas as seguintes variáveis: tipos de lâminas de vidro (comuns e silanizadas); suspensão de *Leishmania* oriundas da cultura *in vitro* (em soro fisiológico ou adição de soro fetal bovino); fixação a seco e tempo de secagem ao ar (1 minuto e 10 minutos) e fixação em etanol a 95%. Soluções contendo promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* provenientes das culturas *in vitro*, contendo no mínimo 10^4 parasitas / mL, foram distribuídas homoganeamente em lâminas mediante distensões delgadas com lamínulas. Lâminas obtidas por aposição, do material biopsiado das lesões de infecções experimentais, foram submetidas aos mesmos parâmetros variáveis descritos para o material das culturas *in vitro*.

As lâminas resultantes das distensões e aposições foram coradas segundo os métodos de May-Grünwald – Giemsa para avaliação, em microscopia ótica, da

aderência (fixação) e integridade morfológica dos parasitos. Para avaliação quantitativa e qualitativa dos parâmetros, foi estabelecido o critério de cruces (0/1+/2+/3+/4+), sendo que (0) refere-se à ausência/desintegrado e (4+) à maior quantidade/integridade, quando analisadas por microscopia ótica, com aumento de 1000x.

Para a metodologia de IHQ este procedimento não foi necessário, considerando que as condições de fixação e conservação do material de biópsias e cortes de tecido já estão estabelecidas pela metodologia histopatológica convencional, sendo amplamente utilizada nos serviços de diagnóstico (BANCROFT & COOK, 1994).

4.8 COLORAÇÃO PELOS MÉTODOS DE MAY-GRÜNWARDL – GIEMSA E HEMATOXILINA-EOSINA

As distensões e aposições preparadas a partir das culturas *in vitro* e *in vivo* de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, submetidas às variáveis de fixação e conservação, foram corados pelo método de May-Grünwald – Giemsa modificado. As lâminas foram recobertas por três minutos, com 10 gotas do corante de May-Grünwald e protegidas por placa de Petri. Em seguida, foram acrescentadas 10 gotas de água destilada tamponada (pH 7,0), misturadas por ligeiros movimentos de inclinação e coradas por mais um minuto. O corante foi desprezado e, sem lavagem, as lâminas foram recobertas com 10 gotas de solução de Giemsa, por quinze minutos. As preparações foram lavadas em água corrente e secas ao ar (PESSÓA & MARTINS, 1982).

As biópsias de lesões obtidas a partir das infecções experimentais, descritas no item 4.6.2, foram submetidas ao procedimento histológico convencional com coloração de hematoxilina-eosina (HE). As amostras foram mantidas por até 72 horas em formol tamponado a 10% e processadas até sua inclusão em blocos de parafina e os cortes histológicos obtidos a partir deste material foram desparafinizados com xilol e reidratados com etanol e água. A seguir, as lâminas foram coradas com hematoxilina (2 minutos), lavadas em água corrente e coradas com eosina (1 minuto). Em seguida, foram desidratadas com álcool absoluto e xilol e a montagem das lâminas permanentes

foi feita com bálsamo do Canadá ou similar (BANCROFT & COOK, 1994).

4.9 CULTURA *IN VITRO* PARA ISOLAMENTO DO PARASITO A PARTIR DE LESÕES

Para isolamento do parasito a partir de lesões cutâneas de casos suspeitos, foram realizadas biópsias das lesões ou aspiração do fluido tecidual. O material obtido foi macerado em condições assépticas com soro fisiológico (0,85%) e antibiótico (penicilina 25.000 UI/mL). Os materiais foram alíquotados em volumes de 0,5 mL, transferidos para o meio de Tobie – Evans e mantidos, a 24 °C, em estufa. Na fase exponencial de crescimento (5º ao 7º dia), o material de cultura era examinado em busca de formas promastigotas, com até quatro repiques sucessivos até o isolamento. Caso negativo, nova pesquisa de promastigotas era efetuada num prazo de 15 dias e persistindo o resultado negativo o material era então descartado.

4.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A metodologia da PCR foi utilizada como método de diagnóstico molecular da LTA, em amostras (biópsias) de lesões ativas da doença.

As amostras de biópsias das lesões, congeladas a -196°C, foram submetidas a processo de maceração, com auxílio de gral e pistilo, em solução tampão (Tris - HCl 100 mM, NaCl 150 mM e EDTA 10 mM, pH 7,4). O macerado foi transferido para tubo de células, homogeneizado com tampão e centrifugado (300x g) para obtenção do sedimento. Este processo e a recuperação do sobrenadante por centrifugação (2500x g) foram repetidos três vezes. A extração do DNA do sedimento observou a seguinte seqüência: Lise celular, remoção de proteínas e RNA e concentração de DNA. Na amplificação do DNA por PCR, foram utilizados os iniciadores b1 (GTGGGCGTATCTGCTGATGAC) e b2 (CAAAAAGCGAGGGACTGCGGA) para *L. (V.) braziliensis* (MIMORI *et al.*, 1998) em diferentes temperaturas de anelamento. A amplificação foi realizada em termociclador (PCR Express-Hybaid), com 10 ng de DNA

em volume final de reação de 25 μ L com 20 μ L de óleo mineral (PEREIRA, 2005).

4.11 DILUIÇÃO DOS SOROS HIPERIMUNES E ANTICORPOS POLICLONAIS PARA APLICAÇÃO EM IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

Foram avaliadas, nas preparações ICQ e IHQ, as diluições dos soros hiperimunes (HPI) e anticorpos policlonais (IgG - SA e IgG - SX) que apresentavam a coloração mais eficiente, com melhor visualização do parasita e com a menor reação inespecífica de fundo (*background*). Neste procedimento, foram preparadas diluições dos anticorpos em tampão PBS pH 7,4 com 0,1% de azida sódica, com títulos de 1/10, 1/100 e 1/1000.

4.12 METODOLOGIA DE IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

As lâminas com distensões e aposições, fixadas em etanol a 95% e os cortes histológicos mantidos em formol tamponado a 10% por até 72 horas, foram submetidos aos processos de ICQ e IHQ, utilizando-se os anticorpos primários específicos (HPI, IgG - SA e IgG - SX) obtidos nas diferentes etapas e complexo avidina-biotina modificado (Ultra Streptavidin®), fabricado por Signet Laboratories Inc. Para biópsias em blocos de parafina, as lâminas com as amostras foram desparafinizadas com xileno, reidratadas e separadamente incubadas com dois reagentes bloqueadores (peróxido de hidrogênio 3% v/v em metanol e soro normal anti-*horseradish* peroxidase – HRP), para bloqueio da peroxidase endógena e um reagente bloqueador (soro normal antifosfatase alcalina) para redução da coloração não-específica de fundo. Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário específico (HPI, IgG - SA ou IgG - SX), nas diluições de 1/10, 1/100 ou 1/1000 em PBS pH 7,4 com 0,1% de azida sódica. Após incubação e lavagem, foi adicionado o anticorpo de ligação biotilado-anticoelho (Ultra Streptavidin®), para ligar-se ao anticorpo primário. Após nova lavagem, foi adicionado o reagente de marcação, composto pelo complexo peroxidase-estreptavidina (Ultra Streptavidin®) em tampão PBS 0,01M, que se liga ao anticorpo biotilado. Após

lavagem com tampão PBS pH 7,4, o sistema é visualizado pela adição do substrato cromogênico (DAB – 3,3' Diaminobenzidina) que é convertido, durante incubação, pela enzima marcada em um precipitado colorido (marrom), no sítio de localização do antígeno. As lâminas foram novamente lavadas e contracoradas com hematoxilina.

Para avaliação quantitativa e qualitativa das preparações, foi estabelecido o critério de cruzes (0/1+/2+/3+/4+), sendo que (0) refere-se à ausência de reatividade/coloração e (4+) à maior reatividade/coloração, quando analisadas em microscopia ótica, com aumentos de 400 e 1000x.

4.13 ESPECIFICIDADE DOS SOROS HIPERIMUNES E ANTICORPOS POLICLONAIS

Com a finalidade de avaliar a especificidade dos soros hiperimunes (HPI) e anticorpos policlonais (IgG - SA ou IgG - SX) produzidos, foram realizadas técnicas imunocitoquímicas em preparações contendo formas promastigotas de *Leishmania* e outros microrganismos obtidos a partir de culturas *in vitro*. Foram utilizados microrganismos comumente encontrados nas lesões de pele de pacientes com LTA, como *Candida albicans* e *Staphylococcus epidermidis*, ou que apresentem lesões cutâneas semelhantes, como o *Histoplasma capsulatum*. Também foram feitas preparações com *Trypanosoma cruzi*, para verificar a possível reação com outros protozoários da Ordem Kinetoplastida.

Suspensões de culturas, em soro fisiológico a 0,9%, dos microrganismos testados foram misturadas com igual volume de suspensões de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. O material foi fixado em lâminas, utilizando-se etanol a 95% e corado por May-Grünwald – Giemsa e método imunocitoquímico.

4.14 ESTABILIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS

A manutenção da atividade imunológica dos anticorpos policlonais purificados (IgG - SX), congelados a - 20°C, em aliquotas com tampão PBS 0,05 M, pH 7,4 e em solução contendo glicerol a 10%, foi avaliada mensalmente por enzímimunoensaio,

considerando-se a manutenção da reatividade dos anticorpos de acordo com a absorbância resultante. Os anticorpos também foram testados para ICQ, utilizando-se preparações contendo formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, conforme descrito nos item 4.6 e 4.12. Para avaliação da estabilidade dos anticorpos policlonais (IgG - SX), foi estabelecido que a intensidade de cor desenvolvida no processo ICQ deveria ser, no mínimo, quantificada em (2+).

4.15 COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE AMASTIGOTAS E ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA*

Com a finalidade de avaliar a sensibilidade da ICQ/IHQ em comparação com outras metodologias utilizadas para o diagnóstico da LTA, foram comparados os resultados obtidos em amostras (biópsias) de lesões ativas da doença. Foram realizadas análises histopatológicas com colorações de hematoxilina-eosina, isolamento em culturas, reações de PCR e preparações de ICQ/IHQ, conforme descrito nos itens 4.8, 4.9, 4.10 e 4.12.

4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comprovação do objetivo desse trabalho, foi utilizada a análise de variância – “teste F” (ANOVA), os testes não-paramétricos “Qui-Quadrado”, “Comparação entre duas Proporções” e “Teste de Comparações Múltiplas” (Teste de Tukey), pelo *software “Primer of Biostatistics”* (GLANTZ, 1997). O nível de significância (probabilidade de significância) adotado foi menor que 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS SOLÚVEL E INSOLÚVEL

Os resultados da concentração de proteínas, volume e biomassa dos antígenos solúveis e insolúveis produzidos a partir de culturas *in vitro* de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* foram bastante similares, não sendo observada diferença significativa entre os mesmos tipos de antígenos das diferentes espécies (tabelas 2 e 3).

TABELA 2 – CONCENTRAÇÃO PROTÉICA (mg/mL) E VOLUME (mL) PRODUZIDOS PELOS ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *L. (V.) braziliensis* E *L. (L.) amazonensis*

ANTÍGENO	VOLUME (mL)	CONCENTRAÇÃO PROTÉICA (mg/mL)
Solúvel <i>L. (V.) braziliensis</i>	12	5,35 (\pm 0,04)
Solúvel <i>L. (L.) amazonensis</i>	15	6,40 (\pm 0,07)

p = 0,771 (proporção).

TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO PROTÉICA (%) E BIOMASSA (g) PRODUZIDOS PELOS ANTÍGENOS INSOLÚVEIS DE *L. (V.) braziliensis* E *L. (L.) amazonensis*

ANTÍGENO	BIOMASSA (peso úmido) (g)	CONCENTRAÇÃO PROTÉICA (%)
Insolúvel <i>L. (V.) braziliensis</i>	2,37	13,65 (\pm 0,06)
Insolúvel <i>L. (L.) amazonensis</i>	2,63	12,21 (\pm 0,09)

p = 0,723 (proporção)

5.2 OBTENÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES

A cinética de produção de anticorpos, pelos animais imunizados, foi avaliada utilizando-se a metodologia de enzimaímunoensaio, nas diluições de 1/100 e 1/200 dos

soros hiperimunes produzidos para cada antígeno utilizado (Tabelas 4 e 5). O resultado do soro controle negativo (animal não imunizado) apresentou absorvância entre 0,004 e 0,047. Tanto para antígenos solúveis quanto insolúveis, a produção de anticorpos foi linear a partir de 45 dias. O ápice da produção de anticorpos foi observado a partir de 45 dias até 65 dias após o início da sensibilização, verificando-se maior concentração (absorvância) para os anticorpos obtidos a partir dos antígenos insolúveis, tanto na diluição 1/100 ($p < 0,0001$) como na diluição 1/200 ($p < 0,0001$) (Figuras 7 e 8).

TABELA 4 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM ANIMAIS IMUNIZADOS COM ANTÍGENOS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS DE *Leishmania* (DILUIÇÃO 1/100)

PERÍODO DA IMUNIZAÇÃO (dias)	OBJETIVO DA SANGRIA	IMUNIZAÇÃO	ABSORVÂNCIA - SORO (Diluição 1/100)			
			Ag Solúvel L. (V.) <i>braziliensis</i>	Ag Insolúvel L. (V.) <i>braziliensis</i>	Ag Solúvel L. (L.) <i>amazonensis</i>	Ag Insolúvel L. (L.) <i>amazonensis</i>
0	Prova	1ª dose	0,064	0,066	0,038	0,044
15	Prova	-	0,077	0,074	0,061	0,068
30	Prova	2ª dose	0,106	0,161	0,106	0,196
45	Prova	3ª dose	0,324	0,657	0,325	0,537
55	Prova	-	0,587	1,183	0,503	1,082
60	Produção	-	0,712	1,713	0,707	1,361
65	Produção	-	0,759	1,748	0,694	1,392

Ag = Antígeno; $p < 0,0001$ (proporção)

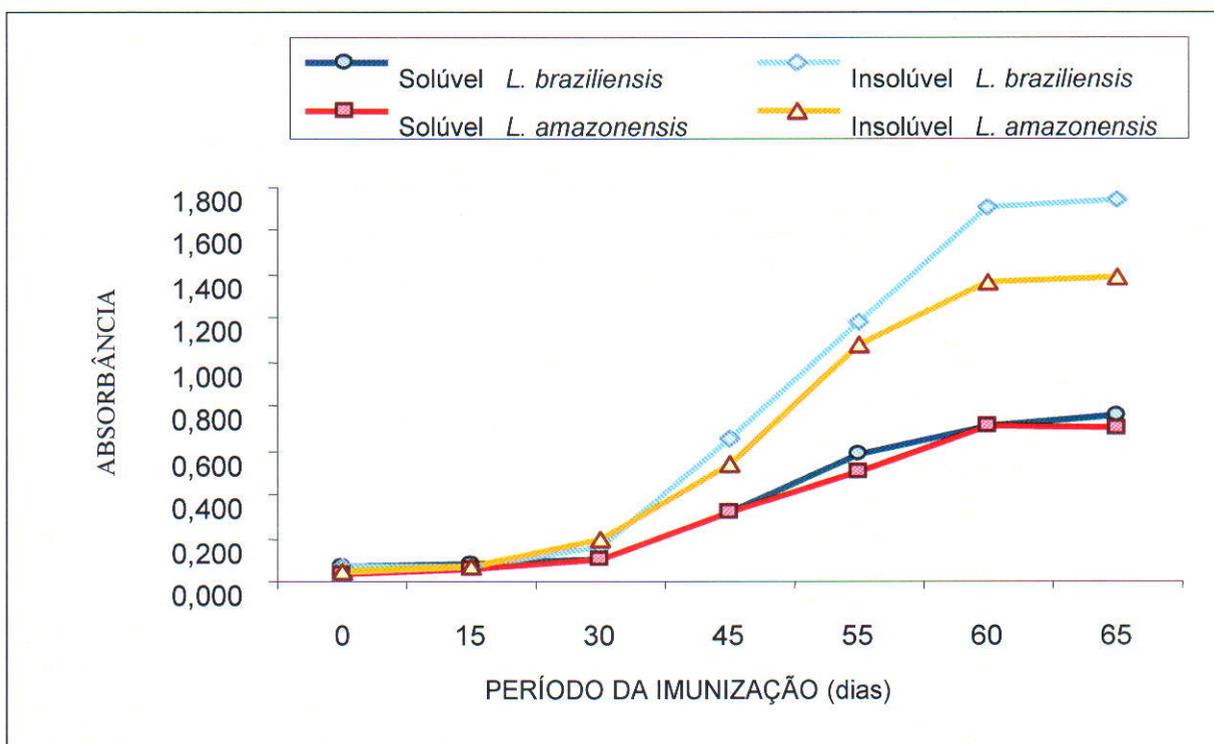


FIGURA 7 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM ANIMAIS IMUNIZADOS COM ANTÍGENOS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS DE *Leishmania* – SORO (DILUIÇÃO 1/100)

TABELA 5 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM ANIMAIS IMUNIZADOS COM ANTÍGENOS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS DE *Leishmania* (DILUIÇÃO 1/200)

PERÍODO DA IMUNIZAÇÃO (dias)	OBJETIVO DA SANGRIA	IMUNIZAÇÃO	ABSORBÂNCIA – SORO (Diluição 1/200)			
			Ag Solúvel <i>L. (V.) braziliensis</i>	Ag Insolúvel <i>L. (V.) braziliensis</i>	Ag Solúvel <i>L. (L.) amazonensis</i>	Ag Insolúvel <i>L. (L.) amazonensis</i>
0	Prova	1ª dose	0,045	0,046	0,030	0,027
15	Prova	-	0,050	0,051	0,039	0,034
30	Prova	2ª dose	0,064	0,077	0,069	0,087
45	Prova	3ª dose	0,157	0,398	0,161	0,223
55	Prova	-	0,353	0,661	0,281	0,579
60	Produção	-	0,541	0,880	0,456	0,605
65	Produção	-	0,582	0,840	0,503	0,609

Ag = Antígeno; $p < 0,0001$ (proporção)

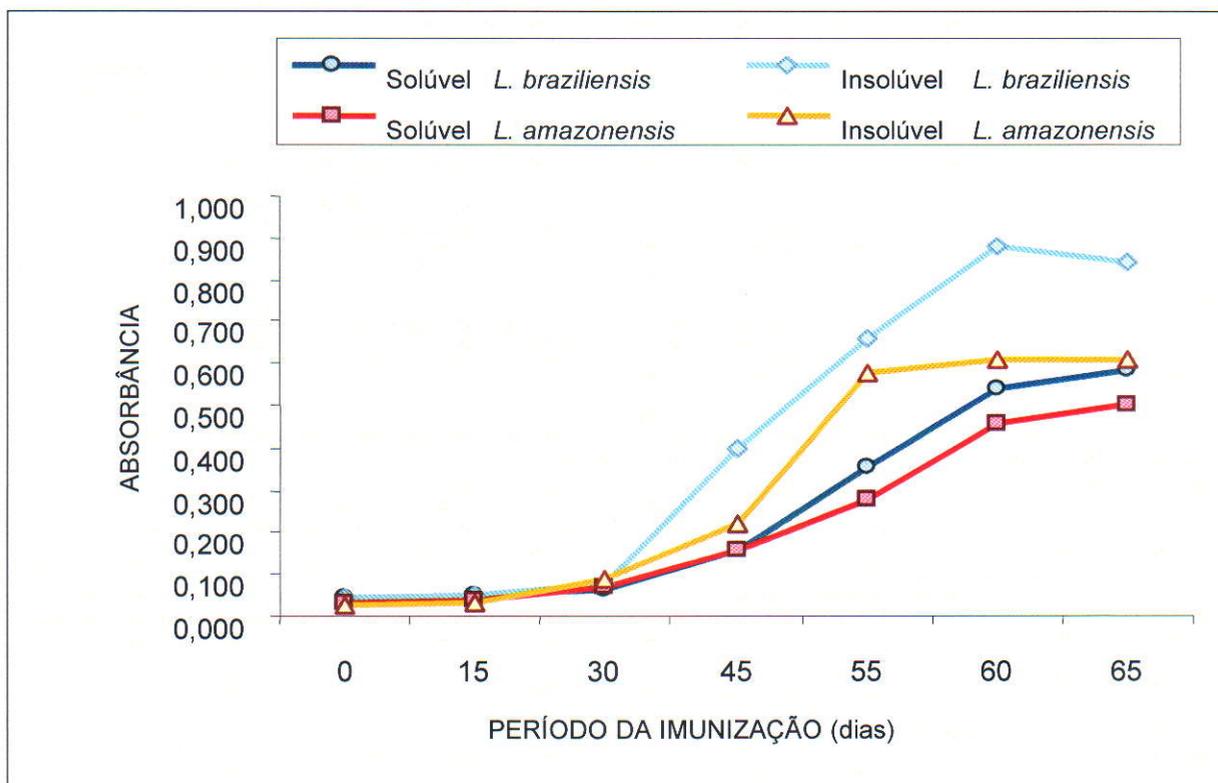


FIGURA 8 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM ANIMAIS IMUNIZADOS COM ANTÍGENOS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS DE *Leishmania* – SORO (DILUIÇÃO 1/200)

5.3 TRATAMENTO DOS SOROS HIPERIMUNES – EXTRAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS (IgG)

Após o processo de extração das imunoglobulinas com a utilização do sulfato de amônio, a concentração de proteínas para os diferentes anticorpos (IgG - SA) produzidos, não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p=0,820$) (Tabela 6).

TABELA 6 – CONCENTRAÇÃO PROTÉICA (mg/mL) E VOLUME (mL) OBTIDO DAS IMUNOGLOBULINAS EXTRAÍDAS POR SULFATO DE AMÔNIO DOS SOROS HIPERIMUNES

IMUNOGLOBULINA EXTRAÍDA	VOLUME (mL)	CONCENTRAÇÃO PROTÉICA (mg/mL)
Anti – Ag Solúvel <i>L. (V.) braziliensis</i>	20	2,83
Anti – Ag Insolúvel <i>L. (V.) braziliensis</i>	20	3,71
Anti – Ag Solúvel <i>L. (L.) amazonensis</i>	20	2,68
Anti – Ag Insolúvel <i>L. (L.) amazonensis</i>	20	3,47

Ag = Antígeno; p = 0,820 (proporção).

Quando analisada a atividade das imunoglobulinas (IgG - SA) (Tabela 7), verificou-se maior reatividade (absorbância) dos anticorpos produzidos a partir dos antígenos insolúveis, tanto na diluição 1/100 ($p < 0,0001$) como na diluição 1/200 ($p < 0,0001$).

TABELA 7 – ATIVIDADE DAS IMUNOGLOBULINAS (ABSORBÂNCIA) EXTRAÍDAS DOS SOROS HIPERIMUNES SUBMETIDAS AO MÉTODO DE ELISA NAS DILUIÇÕES DE 1/100 E 1/200

IMUNOGLOBULINA EXTRAÍDA	ABSORBÂNCIA	
	DIL. 1/100	DIL. 1/200
Anti – Ag Solúvel <i>L. (V.) braziliensis</i>	1,120	0,571
Anti – Ag Insolúvel <i>L. (V.) braziliensis</i>	1,692	1,044
Anti – Ag Solúvel <i>L. (L.) amazonensis</i>	0,799	0,273
Anti – Ag Insolúvel <i>L. (L.) amazonensis</i>	1,342	0,707

Ag = Antígeno; Diluição 1/100 → $p < 0,0001$; Diluição 1/200 → $p < 0,0001$ (proporção); Diluição 1/100 x Diluição 1/200 → $p < 0,0001$ (proporção).

5.4 PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS (ANTICORPOS POLICLONAIS)

Cada pool de frações de imunoglobulinas (IgG - SX), submetido ao processo de purificação cromatográfica em coluna, apresentou resultados de concentração protéica entre 2,34 e 3,18 mg/mL (tabela 8), sem diferença significativa ($p=0,583$).

TABELA 8 – CONCENTRAÇÃO PROTÉICA (mg/mL) E VOLUME (mL) OBTIDO DAS IMUNOGLOBULINAS PURIFICADAS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX®

IMUNOGLOBULINA PURIFICADA	VOLUME (mL)	CONCENTRAÇÃO PROTÉICA (mg/mL)
Anti – Ag Solúvel <i>L. (V.) braziliensis</i>	6	2,62
Anti – Ag Insolúvel <i>L. (V.) braziliensis</i>	7	3,18
Anti – Ag Solúvel <i>L. (L.) amazonensis</i>	6	2,34
Anti – Ag Insolúvel <i>L. (L.) amazonensis</i>	7	2,93

Ag = Antígeno; p = 0,583 (proporção).

Os anticorpos policlonais purificados (IgG - SX), produzidos a partir dos antígenos insolúveis, apresentaram maior reatividade, tanto na diluição 1/100 ($p < 0,0001$) como na diluição 1/200 ($p < 0,0001$) (tabela 9), mesmo utilizando-se antígenos solúveis na metodologia imunoenzimática. Entre as diluições não foi observada diferença significativa ($p = 0,254$).

TABELA 9 – ATIVIDADE DAS IMUNOGLOBULINAS (ABSORBÂNCIA) PURIFICADAS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX® SUBMETIDAS AO MÉTODO DE ELISA NAS DILUIÇÕES DE 1/100 E 1/200

IMUNOGLOBULINA PURIFICADA	ABSORBÂNCIA	
	DIL. 1/100	DIL. 1/200
Anti – Ag Solúvel <i>L. (V.) braziliensis</i>	1,423	0,823
Anti – Ag Insolúvel <i>L. (V.) braziliensis</i>	2,005	1,082
Anti – Ag Solúvel <i>L. (L.) amazonensis</i>	1,025	0,609
Anti – Ag Insolúvel <i>L. (L.) amazonensis</i>	1,748	1,006

Ag = Antígeno; Diluição 1/100 → $p < 0,0001$; Diluição 1/200 → $p < 0,0001$ (proporção); Diluição 1/100 x Diluição 1/200 → $p = 0,254$ (proporção).

5.5 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM, FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO

Na avaliação dos resultados obtidos nos parâmetros de secagem, aderência (fixação) e conservação das amostras em lâminas, utilizando-se material de cultura (*in*

vitro e infecção experimental) e utilizando critérios de quantificação de (0) a (4+), não foi observada diferença significativa em relação aos métodos empregados (Tabelas 10 a 17). Considerando os parâmetros que apresentaram resultados satisfatórios para a aplicação em ICQ e IHQ, optou-se pelo uso de lâminas comuns, secagem ao ar por 10 minutos, sem adição de soro fetal bovino e fixação em etanol a 95% .

TABELA 10 – RESULTADOS DA ADERÊNCIA (QUANTIDADE DE PARASITAS FIXADOS), EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM E FIXAÇÃO, DE AMOSTRAS DE CULTURA *IN VITRO* DE *L. (V.) braziliensis*.

LÂMINAS / DILUENTE	TEMPO DE SECAGEM E FIXAÇÃO / AMOSTRAS											
	Imediato			Secagem 1 min			Secagem 10 min			Fixação a Seco		
	Etanol 95%			Etanol 95%			Etanol 95%					
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
LC / SF	1+	1+	1+	1+	1+	2+	2+	3+	2+	3+	3+	3+
LC / SFB	1+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	3+	3+	4+	4+	3+
LS / SF	2+	2+	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
LS / SFB	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	4+	4+	3+	4+	4+

LC = Lâmina comum; LS = Lâmina silanizada; SF = soro fisiológico; SFB = soro fetal bovino;
 $p = 0,526$ (Qui- Quadrado).

TABELA 11 – RESULTADOS DA ADERÊNCIA (QUANTIDADE DE PARASITAS FIXADOS), EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM E FIXAÇÃO, DE AMOSTRAS DE CULTURA *IN VITRO* DE *L. (L.) amazonensis*.

LÂMINAS / DILUENTE	TEMPO DE SECAGEM E FIXAÇÃO / AMOSTRAS											
	Imediato			Secagem 1 min			Secagem 10 min			Fixação a Seco		
	Etanol 95%			Etanol 95%			Etanol 95%					
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
LC / SF	1+	1+	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
LC / SFB	2+	2+	1+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	4+	4+	3+
LS / SF	2+	2+	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
LS / SFB	2+	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+	3+	4+	4+	4+

LC = Lâmina comum; LS = Lâmina silanizada; SF = soro fisiológico; SFB = soro fetal bovino;
 $p = 0,787$ (Qui-Quadrado).

TABELA 12 – RESULTADOS DA INTEGRIDADE MORFOLÓGICA DOS PARASITAS, EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM E FIXAÇÃO, DE AMOSTRAS DE CULTURA *IN VITRO* DE *L. (V.) braziliensis*.

LÂMINAS / DILUENTE	TEMPO DE SECAGEM E FIXAÇÃO / AMOSTRAS											
	Imediato			Secagem 1 min			Secagem 10 min			Fixação a Seco		
	Etanol 95%			Etanol 95%			Etanol 95%					
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
LC / SF	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
LC / SFB	3+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
LS / SF	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
LS / SFB	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	1+	2+

LC = Lâmina comum; LS = Lâmina silanizada; SF = soro fisiológico; SFB = soro fetal bovino.
 $p = 0,704$ (Qui-Quadrado).

TABELA 13 – RESULTADOS DA INTEGRIDADE MORFOLÓGICA DOS PARASITAS, EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM E FIXAÇÃO, DE AMOSTRAS DE CULTURA *IN VITRO* DE *L. (L.) amazonensis*.

LÂMINAS / DILUENTE	TEMPO DE SECAGEM E FIXAÇÃO / AMOSTRAS											
	Imediato			Secagem 1 min			Secagem 10 min			Fixação a Seco		
	Etanol 95%			Etanol 95%			Etanol 95%					
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
LC / SF	2+	2+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	2+	1+	1+	1+
LC / SFB	2+	2+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
LS / SF	2+	2+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
LS / SFB	3+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	1+	2+

LC = Lâmina comum; LS = Lâmina silanizada; SF = soro fisiológico; SFB = soro fetal bovino.
 $p = 0,598$ (Qui-Quadrado).

TABELA 14 – RESULTADOS DA ADERÊNCIA (QUANTIDADE DE PARASITAS FIXADOS), EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM E FIXAÇÃO, DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *L. (V.) braziliensis*.

LÂMINAS	SECAGEM E FIXAÇÃO / AMOSTRAS											
	Imediato			Secagem 1 min			Secagem 10 min			Fixação a Seco		
	Etanol 95%			Etanol 95%			Etanol 95%					
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
LC	2+	2+	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	4+
LS	2+	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+	4+	3+

LC = Lâmina comum; LS = Lâmina silanizada; $p = 1,000$ (Qui-Quadrado).

TABELA 15 – RESULTADOS DA ADERÊNCIA (QUANTIDADE DE PARASITAS FIXADOS), EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM E FIXAÇÃO, DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *L. (L.) amazonensis*

LÂMINAS	SECAGEM E FIXAÇÃO / AMOSTRAS											
	Imediato			Secagem 1 min			Secagem 10 min			Fixação a Seco		
	Etanol 95%			Etanol 95%			Etanol 95%					
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
LC	2+	2+	2+	3+	3+	2+	4+	4+	3+	4+	4+	4+
LS	2+	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+

LC = Lâmina comum; LS = Lâmina silanizada; p = 1,000 (Qui-Quadrado).

TABELA 16 – RESULTADOS DA INTEGRIDADE MORFOLÓGICA DOS PARASITAS, EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM E FIXAÇÃO, DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *L. (V.) braziliensis*

LÂMINAS	SECAGEM E FIXAÇÃO / AMOSTRAS											
	Imediato			Secagem 1 min			Secagem 10 min			Fixação a Seco		
	Etanol 95%			Etanol 95%			Etanol 95%					
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
LC	4+	4+	4+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+
LS	4+	4+	4+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+

LC = Lâmina comum; LS = Lâmina silanizada; p = 1,000 (Qui-Quadrado).

TABELA 17 – RESULTADOS DA INTEGRIDADE MORFOLÓGICA DOS PARASITAS, EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS PRELIMINARES DE SECAGEM E FIXAÇÃO, DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *L. (L.) amazonensis*

LÂMINAS	SECAGEM E FIXAÇÃO / AMOSTRAS											
	Imediato			Secagem 1 min			Secagem 10 min			Fixação a Seco		
	Etanol 95%			Etanol 95%			Etanol 95%					
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
LC	4+	4+	4+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+
LS	4+	4+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+

LC = Lâmina comum; LS = Lâmina silanizada; p = 1,000 (Qui-Quadrado).

5.6 COLORAÇÃO PELOS MÉTODOS DE MAY-GRÜNWARDL – GIEMSA E HEMATOXILINA-EOSINA

Distensões, esfregaços por aposição e cortes histológicos preparados a partir das culturas *in vitro* e infecções experimentais com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, submetidos às variáveis de fixação e conservação, corados pelo método de May-Grünwald – Giemsa e hematoxilina-eosina (figuras 9 a 11).

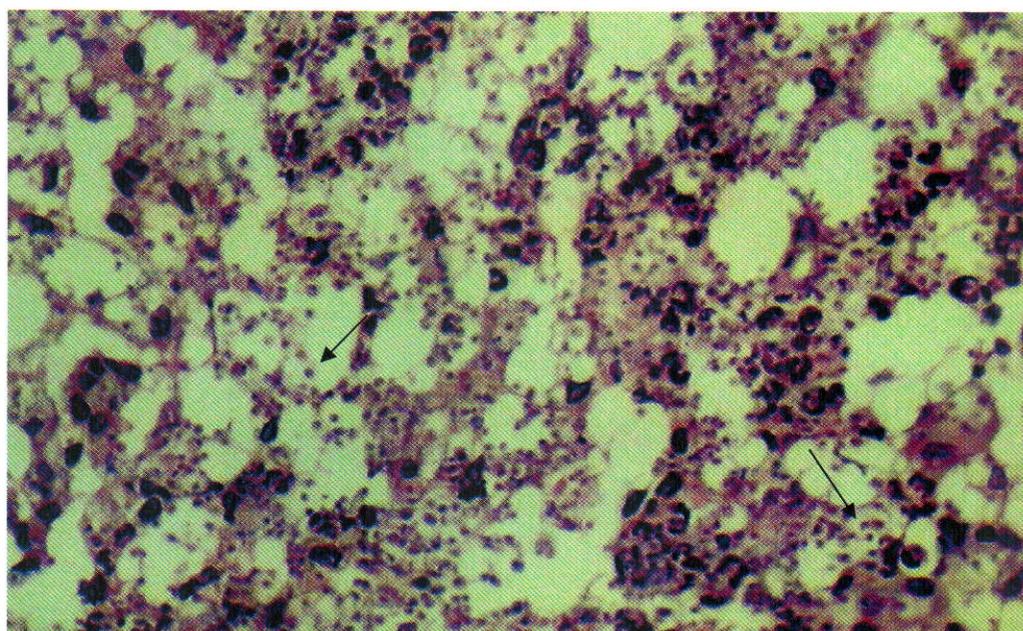


FIGURA 9 – INFECÇÃO EXPERIMENTAL (HAMSTER) COM *L. (V.) braziliensis*, APÓS 60 DIAS DE INOCULAÇÃO. FORMAS AMASTIGOTAS CORADAS POR MAY-GRÜNWARDL – GIEMSA PARA AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE SECAGEM, FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO. AUMENTO DE 400X (MICROSCOPIA ÓTICA).



FIGURA 10 – CULTURA *IN VITRO* DE *L. (L.) amazonensis*. FORMAS PROMASTIGOTAS CORADAS POR MAY-GRÜNWARD – GIEMSA PARA AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE SECAGEM, FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO. AUMENTO 1000X.

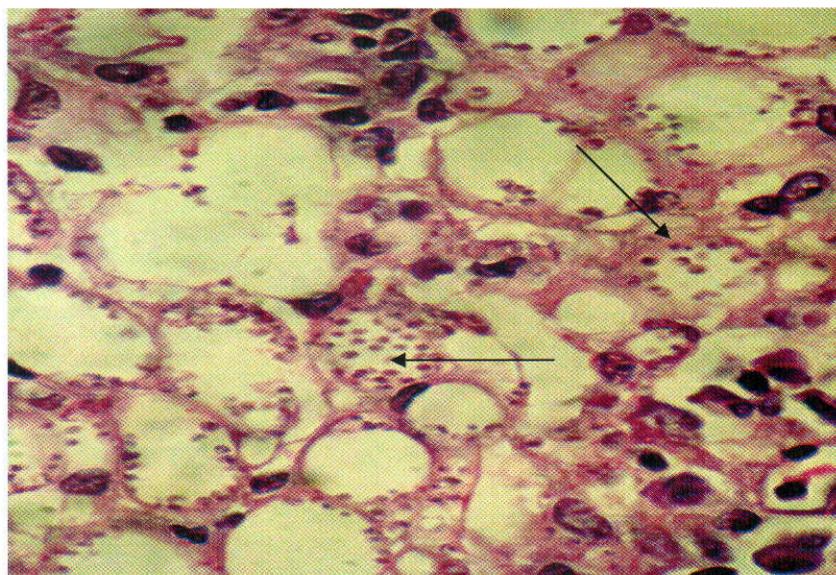


FIGURA 11 – INFECÇÃO EXPERIMENTAL (HAMSTER) COM *L. (V.) braziliensis*, APÓS 60 DIAS DE INOCULAÇÃO. FORMAS AMASTIGOTAS CORADAS POR HEMATOXILINA-EOSINA PARA AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE SECAGEM, FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO. AUMENTO DE 1000X.

5.7 RESULTADOS DA IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

Os resultados da ICQ/IHQ dos esfregaços, *imprints* e seções de tecidos (Figuras 13 e 19), utilizando as imunoglobulinas em diferentes etapas de purificação (HPI, IgG - SA e IgG - SX), obtidas a partir da sensibilização com antígenos solúvel e insolúvel, apresentaram reatividade imunocitoquímica / imunohistoquímica com diferença significativa. De acordo com a análise de variância (teste F) dos resultados apresentados nas Tabelas 18 a 21, os valores de p entre 0,00506161 e 0,0582562 indicaram haver diferença significativa, a 5% de probabilidade, entre os tratamentos (nível de purificação) dos soros. Aplicando o teste de comparações múltiplas (teste de Tukey), pode ser observado que as imunoglobulinas purificadas por cromatografia em coluna com Sephadex® (IgG - SX) e obtidas a partir do antígeno insolúvel apresentaram maior reatividade nas diferentes preparações avaliadas. Nas figuras 12, 14, 16 e 17, as representações gráficas (A) indicam o agrupamento das purificações, para as duas espécies avaliadas, representadas pelos números 1 (HPI - Ag solúvel), 2 (HPI - Ag insolúvel), 3 (IgG - SA - Ag solúvel), 4 (IgG - SA - Ag insolúvel), 5 (IgG - SX - Ag solúvel) e 6 (IgG - SX - Ag insolúvel), em que o grupo 6 é diferente dos demais, principalmente em relação aos grupos 1 e 2. Nas representações gráficas (B) as barras longitudinais referem-se aos resultados das comparações entre os diversos soros em diferentes tratamentos, representados por T1 a T6, com a mesma denominação descrita em (A). As barras referentes às comparações que não cortam o eixo vertical (abscissa 0) (pontilhado), indicam haver diferença significativa. As comparações com resultados representados pelas barras mais distantes do eixo vertical (abscissa 0) e com valor positivo maior (à direita na abscissa), são as que apresentam maior diferença. As comparações entre T1 (HPI - Ag solúvel) e T6 (IgG - SX - Ag insolúvel) e entre T2 (HPI - Ag insolúvel) e T6 (IgG - SX - Ag insolúvel) apresentaram a maior diferença.

Na avaliação das diluições dos anticorpos utilizadas no processo, optou-se pela utilização de diluições de 1/100, por apresentarem resultados apropriados para preparações ICQ/IHQ, com boa imunorreatividade e baixa ocorrência de reações inespecíficas de fundo (*background*).

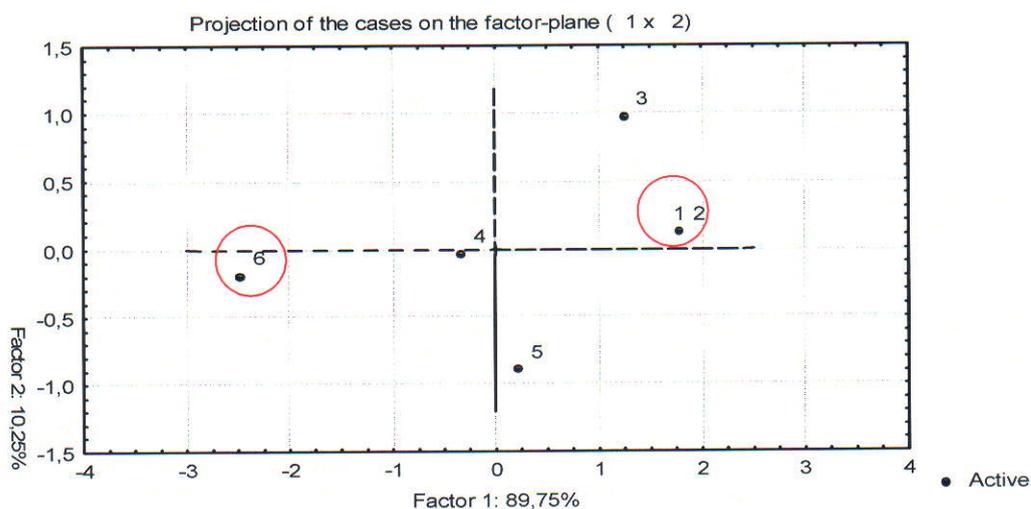
Na avaliação da reatividade das imunoglobulinas obtidas a partir de antígenos de *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis* frente a parasitas destas duas espécies (Tabelas 22 e 23), não foi observada diferença significativa. Nos resultados que avaliaram a quantidade de parasitos fixados nas lâminas e a integridade morfológica deles, não foi observada diferença significativa.

TABELA 18 – IMUNOCITOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE CULTURA *IN VITRO* DE *L. (V.) braziliensis*, COM IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO. (DILUIÇÃO 1/100)

ORIGEM DAS IMUNOGLOBULINAS / AMOSTRAS	QUANTIDADE DE PARASITOS			INTEGRIDADE MORFOLÓGICA			REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA		
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
HPI - Ag SOL. <i>L. (V.) braziliensis</i>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+ (*)	2+ (*)	2+ (*)
HPI - Ag INSOL. <i>L. (V.) braziliensis</i>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+ (*)	2+
IgG - SA - Ag SOL <i>L. (V.) braziliensis</i>	3+	2+	3+	3+	2+	3+	2+ (*)	2+	3+
IgG - SA - Ag INSOL <i>L. (V.) braziliensis</i>	3+	3+	2+	3+	3+	2+	3+	3+	3+ (*)
IgG - SX - Ag SOL <i>L. (V.) braziliensis</i>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+
IgG - SX - Ag INSOL <i>L. (V.) braziliensis</i>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	4+	4+	4+

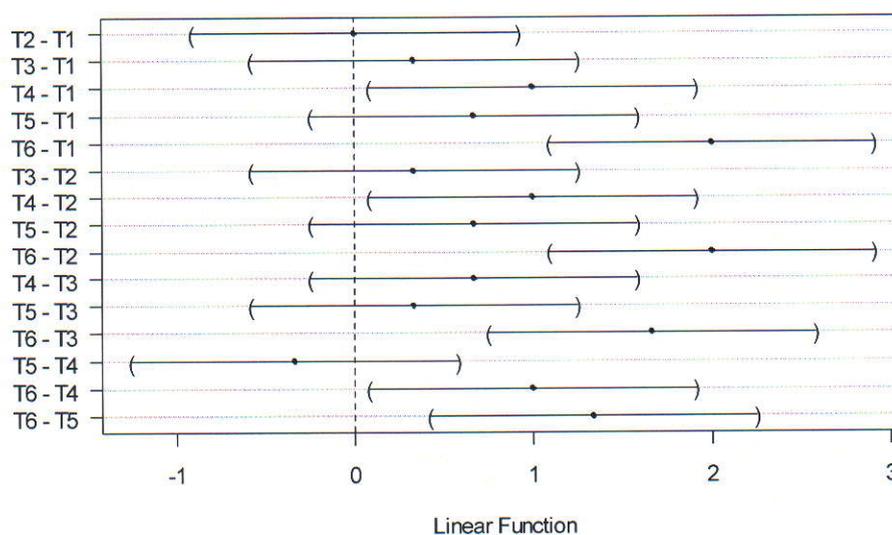
HPI = Soro hiperimune; IgG - SA = pool de IgG extraída por precipitação com sulfato de amônio; IgG - SX = IgG purificada por cromatografia em coluna com SEPHADEX®; Ag SOL = antígeno solúvel; Ag INSOL = antígeno insolúvel. p = 0,0462276 (análise de variância)

(*): Presença de coloração inespecífica de fundo (*background*)



(A)

95% family-wise confidence level



(B)

FIGURA 12 – COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DOS RESULTADOS DA REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA DE IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO NA DILUIÇÃO 1/100, FRENTE A AMOSTRAS DE CULTURA *IN VITRO* DE *L. (V.) braziliensis*. (Teste de Tukey)

T1 = HPI - Ag SOL. *L. (V.) braziliensis*; T2 = HPI - Ag INSOL. *L. (V.) braziliensis*; T3 = IgG - SA Ag SOL *L. (V.) braziliensis*; T4 = IgG - SA Ag INSOL *L. (V.) braziliensis*; T5 = IgG - SX Ag SOL *L. (V.) braziliensis*; T6 = IgG - SX Ag INSOL. *L. (V.) braziliensis*.



FIGURA 13 – PROMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis* OBTIDAS DE CULTURA *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA NA DILUIÇÃO 1/100. AUMENTO 1000X.

TABELA 19 – IMUNOCITOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE CULTURA *IN VITRO* DE *L. (L.) amazonensis*, COM IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO. (DILUIÇÃO 1/100)

ORIGEM DAS IMUNOGLOBULINAS / AMOSTRAS	QUANTIDADE DE PARASITOS			INTEGRIDADE MORFOLÓGICA			REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA		
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
HPI - Ag SOL. <i>L.(L.) amazonensis</i>	3+	3+	2+	3+	3+	2+	2+(*)	2+	2+(*)
HPI - Ag INSOL. <i>L.(L.) amazonensis</i>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+(*)	3+	2+
IgG - S A Ag SOL <i>L.(L.) amazonensis</i>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+(*)	2+
IgG - S A Ag INSOL <i>L.(L.) amazonensis</i>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+(*)	3+	3+
IgG - SX Ag SOL <i>L.(L.) amazonensis</i>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+
IgG - SX Ag INSOL <i>L.(L.) amazonensis</i>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	4+	4+	4+

HPI = Soro hiperimune; IgG - SA = pool de IgG extraída por precipitação com sulfato de amônio; IgG - SX = IgG purificada por cromatografia em coluna com SEPHADEX®; Ag SOL = antiantígeno solúvel; Ag INSOL = antiantígeno insolúvel. p = 0,058256 (análise de variância)

(*): Presença de coloração inespecífica de fundo (*background*)

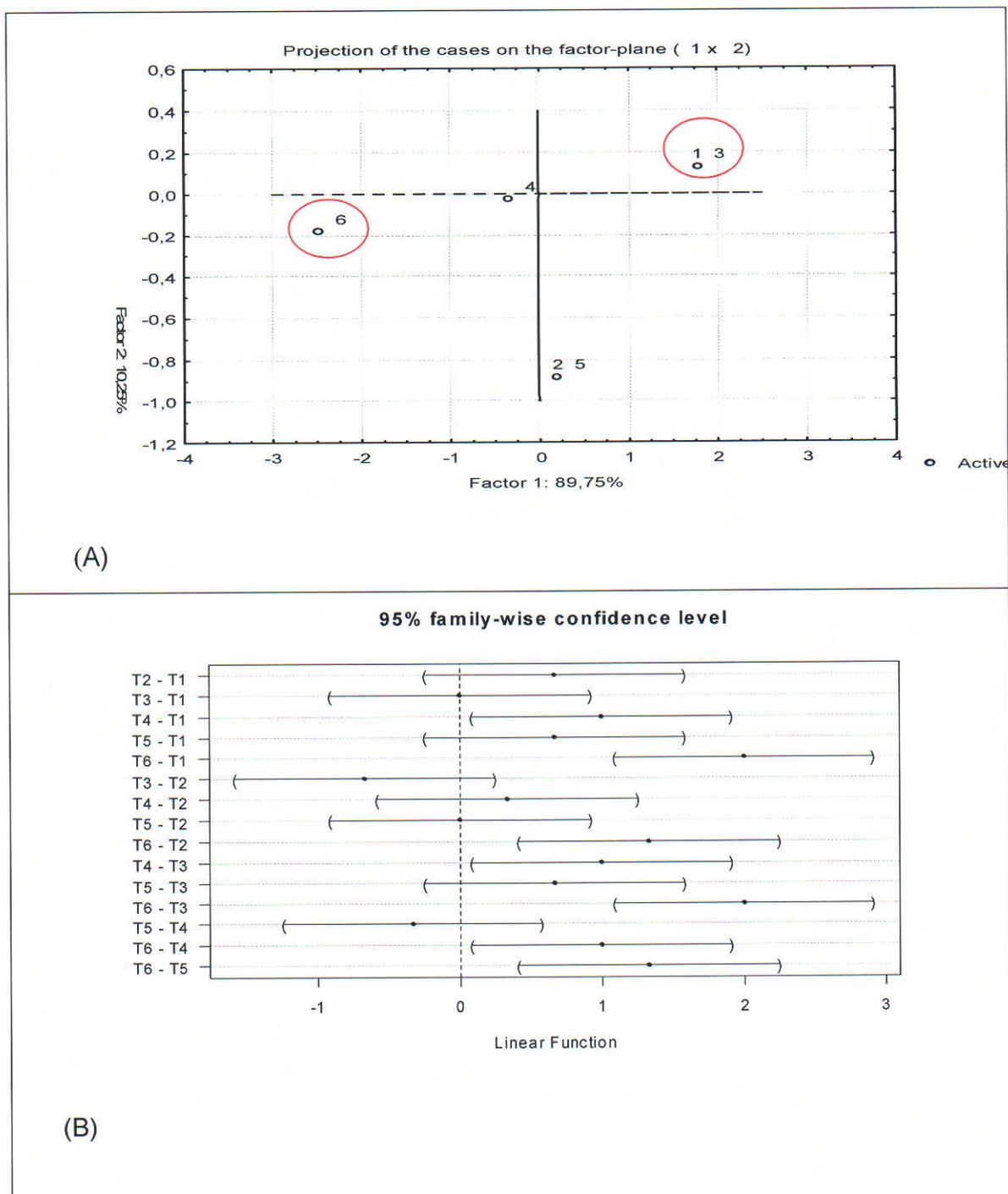


FIGURA 14 – COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DOS RESULTADOS DA REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA DE IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO NA DILUIÇÃO 1/100, FRENTE A AMOSTRAS DE CULTURA *IN VITRO* DE *L. (L.) amazonensis*. (Teste de Tukey).
 T1 = HPI - Ag SOL. *L. (L.) amazonensis*; T2 = HPI - Ag INSOL. *L. (L.) amazonensis*; T3 = IgG - SA Ag SOL *L. (L.) amazonensis*; T4 = IgG - SA Ag INSOL *L. (L.) amazonensis*; T5 = IgG - SX Ag SOL *L. (L.) amazonensis*; T6 = IgG - SX Ag INSOL *L. (L.) amazonensis*.



FIGURA 15 – PROMASTIGOTAS DE *L. (L.) amazonensis* OBTIDAS DE CULTURA *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA NA DILUIÇÃO 1/100. AUMENTO 1000X.

TABELA 20 – IMUNOCITOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *L. (V.) braziliensis* E IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO. (DILUIÇÃO 1/100)

ORIGEM DAS IMUNOGLOBULINAS / AMOSTRAS	QUANTIDADE DE PARASITOS			INTEGRIDADE MORFOLÓGICA			REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA		
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
HPI - Ag SOL <i>L. (V.) braziliensis</i>	2+	2+	1+	3+	3+	2+	2+ (*)	2+ (*)	2+
HPI - Ag INSOL <i>L. (V.) braziliensis</i>	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+ (*)	2+	3+
IgG - SA Ag SOL <i>L. (V.) braziliensis</i>	2+	2+	2+	3+	2+	3+	2+	2+ (*)	2+
IgG - SA Ag INSOL <i>L. (V.) braziliensis</i>	1+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
IgG - SX Ag SOL <i>L. (V.) braziliensis</i>	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+ (*)	3+	3+
IgG - SX Ag INSOL <i>L. (V.) braziliensis</i>	2+	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+	4+

HPI = Soro hiperimune; IgG - SA = pool de IgG extraída por precipitação com sulfato de amônio; IgG - SX = IgG purificada por cromatografia em coluna com SEPHADEX®; Ag SOL = antígeno solúvel; Ag INSOL = antígeno insolúvel. p = 0,005061 (análise de variância)

(*): Presença de coloração inespecífica de fundo (*background*)

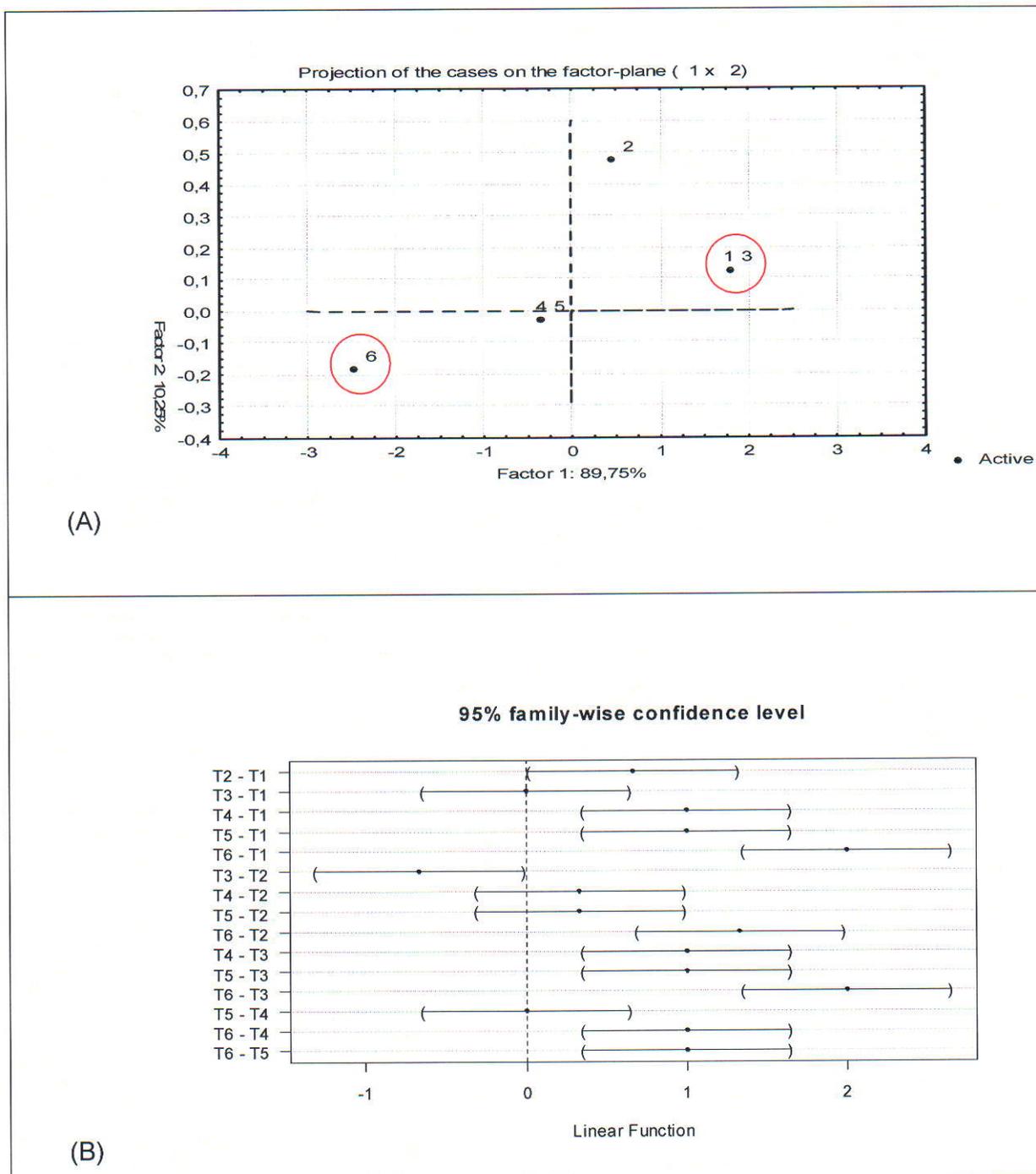


FIGURA 16 – COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DOS RESULTADOS DA REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA DE IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO NA DILUIÇÃO 1/100, FRENTE A AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *L. (V.) braziliensis*. (Teste de Tukey).

T1 = HPI - Ag SOL. *L. (V.) braziliensis*; T2 = HPI - Ag INSOL. *L. (V.) braziliensis*;

T3 = IgG - S A Ag SOL *L. (V.) braziliensis*; T4 = IgG - S A Ag INSOL *L. (V.) braziliensis*;

T5 = IgG - SX Ag SOL *L. (V.) braziliensis*; T 6 = IgG - SX Ag INSOL *L. (V.) braziliensis*.

TABELA 21 – IMUNOCITOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *L. (L.) amazonensis* E IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO. (DILUIÇÃO 1/100)

ORIGEM DAS IMUNOGLOBULINAS / AMOSTRAS	QUANTIDADE DE PARASITOS			INTEGRIDADE MORFOLÓGICA			REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA		
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
HPI - Ag SOL. <i>L.(L.) amazonensis</i>	3+	3+	3+	3+	2+	3+	2+	2+(*)	2+
HPI - Ag INSOL. <i>L.(L.) amazonensis</i>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+
IgG - SA Ag SOL <i>L.(L.) amazonensis</i>	3+	3+	2+	3+	3+	3+	2+(*)	2+	2+
IgG - SA Ag INSOL <i>L.(L.) amazonensis</i>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+(*)
IgG - SX Ag SOL <i>L.(L.) amazonensis</i>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	4+
IgG - SX Ag INSOL <i>L.(L.) amazonensis</i>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	4+	4+	4+

HPI = Soro hiperimune; IgG - SA = pool de IgG extraída por precipitação com sulfato de amônio; IgG - SX = IgG purificada por cromatografia em coluna com SEPHADEX®; Ag SOL = antígeno solúvel; Ag INSOL = antígeno insolúvel. $p = 0,034855$ (análise de variância).

(*): Presença de coloração inespecífica de fundo (*background*).

TABELA 22 – IMUNOHISTOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *L. (V.) braziliensis*, COM IMUNOGLOBULINAS PURIFICADAS (DILUIÇÃO 1/100).

ORIGEM DAS IMUNOGLOBULINAS / AMOSTRAS	QUANTIDADE DE PARASITOS			INTEGRIDADE MORFOLÓGICA			REATIVIDADE IMUNOHISTOQUÍMICA		
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
IgG - SX Ag INSOL <i>L. (V.) braziliensis</i>	2+	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+	4+
IgG - SX Ag INSOL <i>L. (L.) amazonensis</i>	2+	2+	2+	3+	2+	3+	4+	3+	3+

IgG - SX = IgG purificada por cromatografia em coluna SEPHADEX®; Ag INSOL = antígeno insolúvel. $p = 0,989$ (Qui-Quadrado).

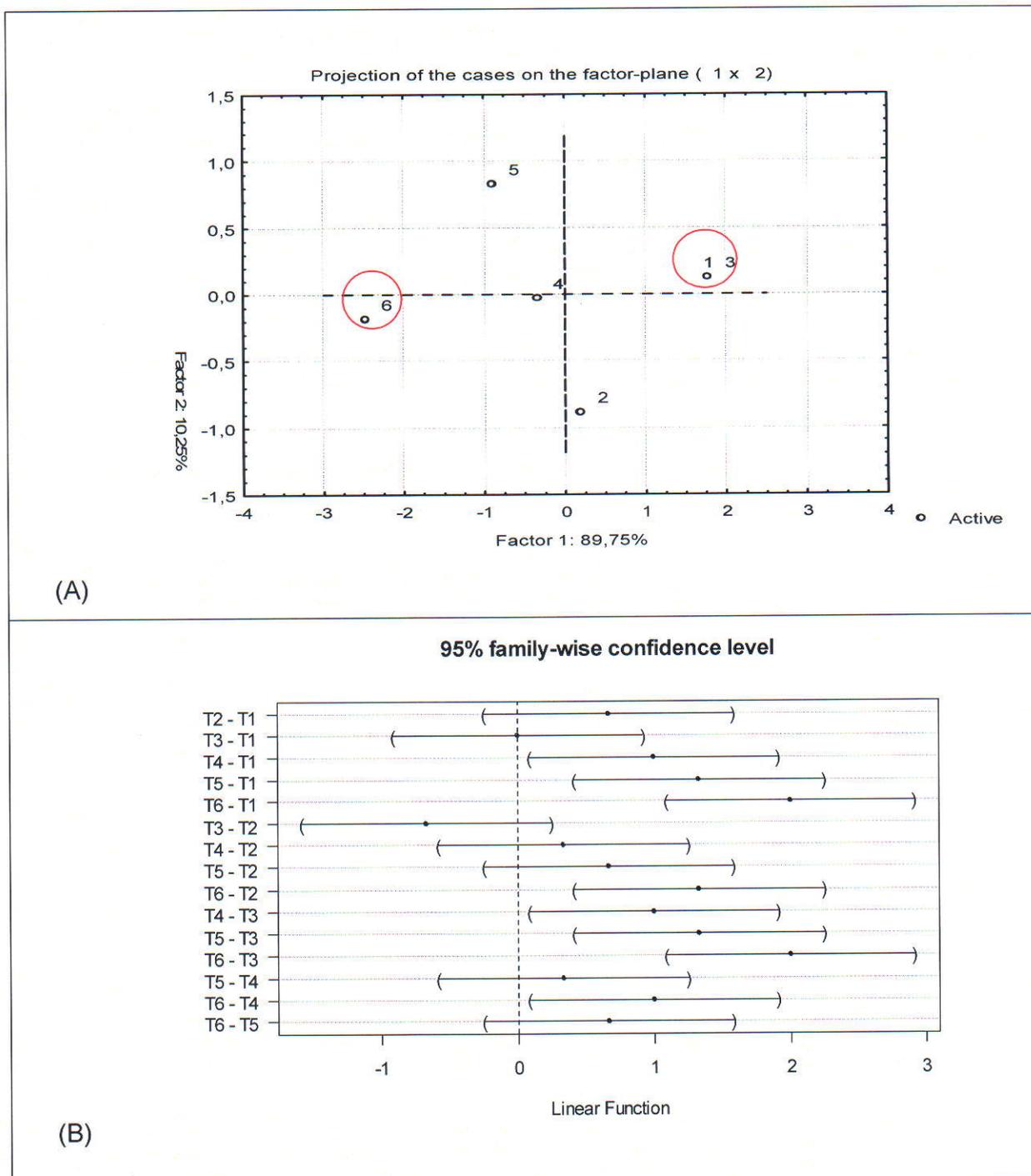


FIGURA 17 – COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DOS RESULTADOS DA REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA DE IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO NA DILUIÇÃO 1/100, FRENTE A AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *L. (L.) amazonensis*. (Teste de Tukey).

T1 = HPI - Ag SOL *L. (L.) amazonensis*; T2 = HPI - Ag INSOL. *L. (L.) amazonensis*; T3 = IgG - SA Ag SOL *L. (L.) amazonensis*; T4 = IgG - SA Ag INSOL *L. (L.) amazonensis*; T5 = IgG - SX Ag SOL *L. (L.) amazonensis*; T6 = IgG - SX Ag INSOL *L. (L.) amazonensis*.

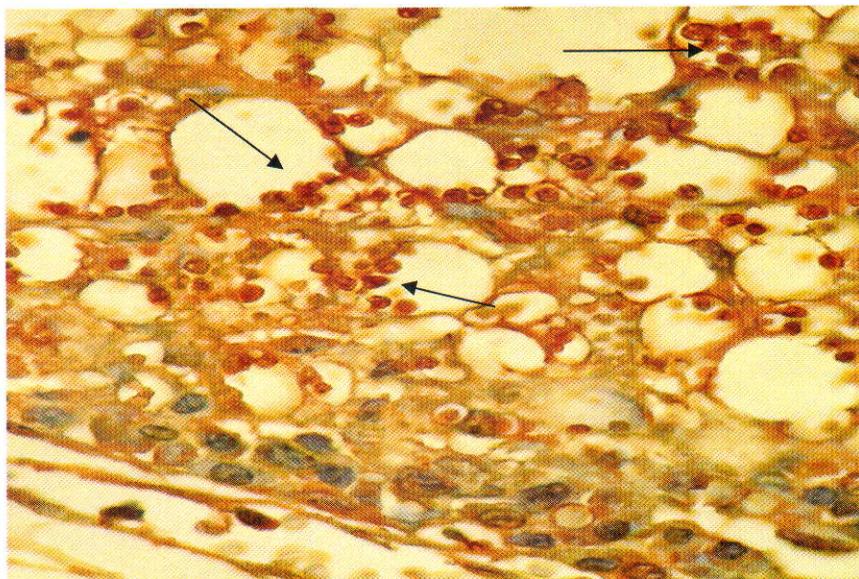


FIGURA 18 – FORMAS AMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis* OBTIDAS DE BIÓPSIA (CORTES HISTOLÓGICOS) PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE IMUNOHISTOQUÍMICA COM ANTICORPOS POLICLONAIS (IgG – SX) ANTIANTÍGENOS INSOLÚVEIS DE *L. (V.) braziliensis*. AUMENTO DE 1000X.

TABELA 23 – IMUNOHISTOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL (BIÓPSIA) DE *L. (L.) amazonensis*, COM IMUNOGLOBULINAS PURIFICADAS (DILUIÇÃO 1/100).

ORIGEM DAS IMUNOGLOBULINAS / AMOSTRAS	QUANTIDADE DE PARASITOS			INTEGRIDADE MORFOLÓGICA			REATIVIDADE IMUNOHISTOQUÍMICA		
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
IgG – SX Ag INSOL <i>L. (L.) amazonensis</i>	3+	3+	2+	3+	2+	3+	4+	4+	3+
IgG – SX Ag INSOL <i>L. (V.) braziliensis</i>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	4+	3+	3+

IgG – SX = IgG purificada por cromatografia em coluna SEPHADEX®; Ag INSOL = antiantígeno insolúvel.
 $p = 0,971$ (Qui-Quadrado).

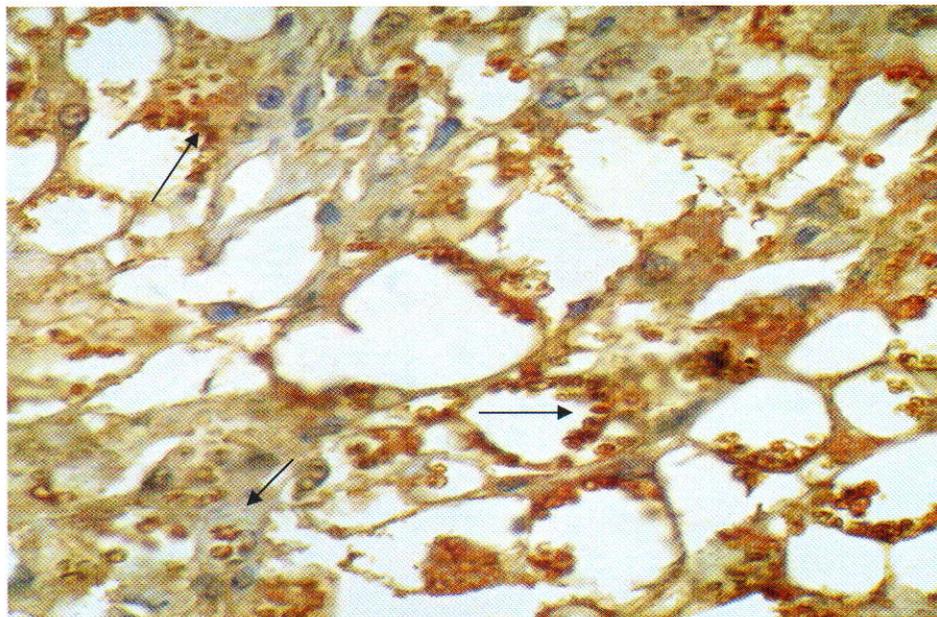


FIGURA 19 – FORMAS AMASTIGOTAS DE *L. (L.) amazonensis* OBTIDAS DE BIÓPSIA (CORTES HISTOLÓGICOS) PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE IMUNOHISTOQUÍMICA COM ANTICORPOS POLICLONAIS (IgG – SX) ANTIANTÍGENOS INSOLÚVEIS DE *L. (L.) amazonensis*. AUMENTO DE 1000X.

5.8 ESPECIFICIDADE DOS SOROS HIPERIMUNES E ANTICORPOS POLICLONAIS

Os resultados da avaliação da especificidade dos soros hiperimunes e anticorpos policlonais, utilizados nas preparações contendo *Leishmania* e outros microorganismos, a partir de culturas *in vitro* (Tabelas 24 e 25), indicaram ausência de reação imunocitoquímica (0) para os microorganismos não pertencentes à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Foi observada reatividade entre (1+) e (2+) para *T. cruzi* e (3+) a (4+) para as espécies de *Leishmania*, indicando especificidade de 100% para estes parasitos nestas amostras. A avaliação da reatividade imunocitoquímica, pela microscopia ótica (Figura 20), em comparação com coloração de May-Grünwald – Giemsa (Figura 21), demonstra que os anticorpos obtidos apresentam a especificidade requisitada para a metodologia de ICQ.

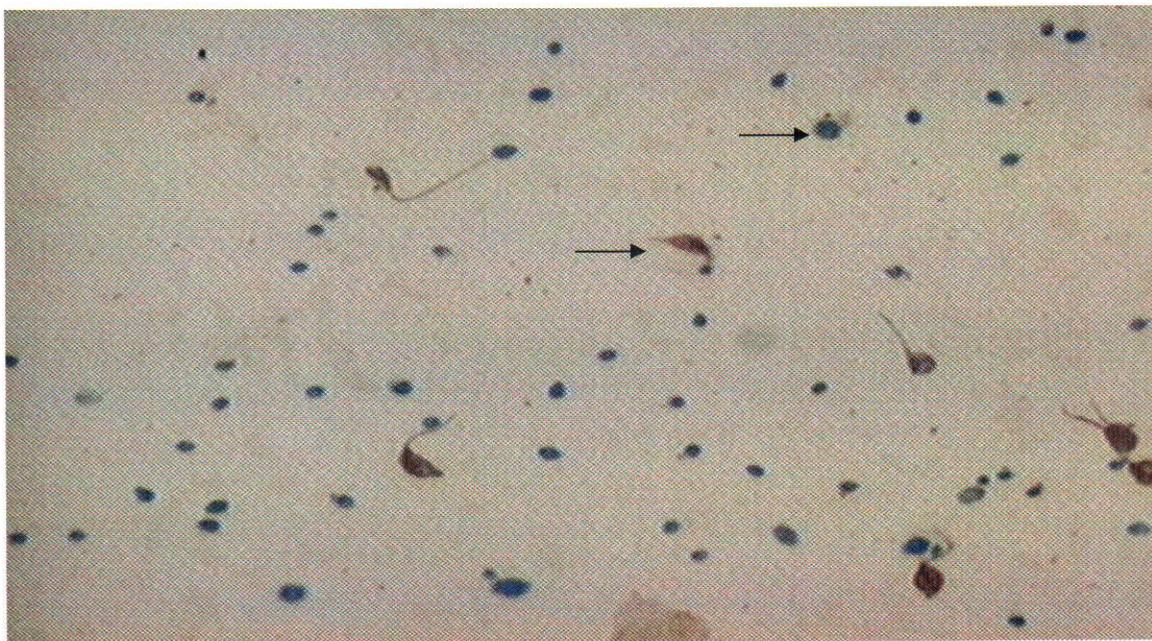


FIGURA 20 – IMUNOCITOQUÍMICA DE *L. (L.) amazonensis* (FORMAS PROMASTIGOTAS) E *Candida albicans* PARA AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE, COM ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI-*L. (L.) amazonensis* NA DILUIÇÃO DE 1/100. AUMENTO 400X.

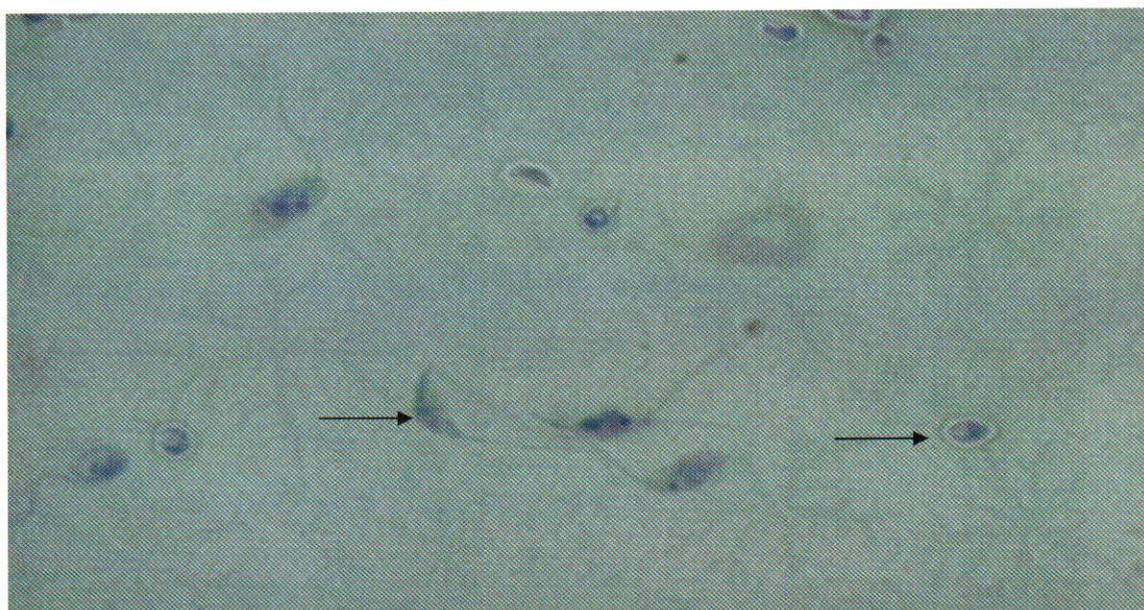


FIGURA 21 – COLORAÇÃO DE MAY-GRÜNWARD - GIEMSA EM PREPARAÇÃO CONTENDO *L. (L.) amazonensis* E *Candida albicans*. AUMENTO 1000X.

TABELA 24 – ESPECIFICIDADE DOS SOROS HIPERIMUNES E ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI - *L. (V.) braziliensis* (Ag insolúvel), EM IMUNOCITOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE CULTURAS *IN VITRO*.

AMOSTRA	QUANTIDADE			INTEGRIDADE MORFOLÓGICA			REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA									
							HPI			IgG - SA			IgG - SX			
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	
<i>L. (V.) braziliensis</i>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
											(*)					
<i>L. (L.) amazonensis</i>	3+	3+	2+	3+	3+	2+	3+	2+	3+	3+	3+	4+	4+	4+	3+	4+
<i>C. albicans</i>	3+	2+	3+	4+	4+	4+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
											(*)					
<i>H. capsulatum</i>	4+	4+	4+	3+	3+	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
											(*)				(*)	
<i>S. epidermidis</i>	4+	4+	4+	3+	3+	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
							(*)				(*)					
<i>T. cruzi</i>	1+	2+	1+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	2+	1+	1+
											(*)					
<i>L. (V.) braziliensis / L. (L.) amazonensis</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>L. (V.) braziliensis / C. albicans</i>	3+/3+	3+/3+	3+/3+	3+/3+	3+/4+	3+/4+	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	4+/0	4+/0	4+/0
											(*)					
<i>L. (V.) braziliensis / H. capsulatum</i>	3+/4+	3+/4+	3+/3+	3-/3+	3+/3+	3+/3+	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0
							(*)				(*)					
<i>L. (V.) braziliensis / S. epidermidis</i>	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/3+	3+/3+	3+/3+	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0
											(*)					
<i>L. (V.) braziliensis / T. cruzi</i>	3+/1+	3+/1+	2+/1+	3+/3+	3+/3+	3+/2+	3+/2+	3+/2+	3+/2+	4+/2+	3+/2+	4+/2+	4+/2+	4+/1+	4+/1+	4+/1+
											(*)					

HPI = Soro hiperimune; IgG - SA = pool de IgG extraída por precipitação com sulfato de amônio; IgG - SX = IgG purificada por cromatografia em coluna com SEPHADEX®; ND = Não determinado

(*): Presença de coloração inespecífica de fundo (*background*).

TABELA 26 – ESPECIFICIDADE DOS SOROS HIPERIMUNES E ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-*L.(L.) amazonensis* (Ag insolúvel), EM IMUNOCITOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE CULTURAS *IN VITRO*.

AMOSTRA	QUANTIDADE			INTEGRIDADE MORFOLÓGICA			REATIVIDADE IMUNOCITOQUÍMICA								
							Soro HPI			IgG - SA			IgG - SX		
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
<i>L. (L.) amazonensis</i>	3+	3+	3+	3+	2+	3+	2+	3+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
<i>L. (V.) braziliensis</i>	3+	3+	2+	3+	3+	2+	3+	2+	3+	4+	3+	4+	4+	4+	4+
<i>C. albicans</i>	3+	2+	3+	4+	4+	4+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. capsulatum</i>	4+	4+	3+	3+	3+	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	4+	4+	4+	3+	3+	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. cruzi</i>	1+	2+	1+	2+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	2+	2+	2+	1+	1+
<i>L. (L.) amazonensis / L. (V.) braziliensis</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>L. (L.) amazonensis / C. albicans</i>	3+/3+	3+/3+	3+/3+	3+/3+	3+/4+	3+/4+	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	4+/0	4+/0
<i>L. (L.) amazonensis / H. capsulatum</i>	3+/4+	3+/4+	3+/3+	3+/3+	3+/3+	3+/3+	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0
<i>L. (L.) amazonensis / S. epidermidis</i>	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/3+	3+/3+	2+/3+	3+/0	3+/0	2+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0	3+/0
<i>L. (L.) amazonensis / T. cruzi</i>	3+/1+	3+/1+	2+/1+	3+/3+	3+/3+	3+/2+	3+/2+	3+/2+	3+/2+	4+/2+	4+/1+	4+/2+	4+/1+	4+/1+	4+/1+

HPI = Soro hiperimune; IgG - SA = pool de IgG extraída por precipitação com sulfato de amônio; IgG - SX = IgG purificada por cromatografia em coluna com SEPHADEX®; ND = Não determinado

(*): Presença de coloração inespecífica de fundo (*background*).

5.9 ESTABILIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS

Os resultados da estabilidade dos anticorpos policlonais (IgG - SX), congelados a -20°C em alíquotas em tampão PBS 0,05 M, pH 7,4 e em solução contendo glicerol a 10% indicaram manutenção da atividade imunológica adequada ao processo imunocitoquímico, considerando uma avaliação da intensidade de cor de no mínimo (2+) nas preparações ICQ. Neste critério, a reatividade avaliada pelo método de ELISA foi mantida até o 10º mês para os anticorpos obtidos a partir do antígeno solúvel, com absorbâncias de 0,381 (PBS 0,05 M) e 0,392 (glicerol 10%) para *L.(V.) braziliensis*,

0,327 (PBS 0,05 M) e 0,318 (glicerol 10%) para *L.(L.) amazonensis*. Para os anticorpos obtidos a partir do antígeno insolúvel, a reatividade imunocitoquímica de (2+) foi observada até o 11º mês, com absorvâncias de 0,307 (PBS 0,05 M) e 0,322 (glicerol 10%) para *L.(V.) braziliensis* e 0,289 (PBS 0,05 M) e 0,303 (glicerol 10%) para *L.(L.) amazonensis*. Os controles negativos nos ensaios imunoenzimáticos apresentaram absorvâncias entre 0,009 e 0,061 (Tabelas 26 e 27 e Figuras 22 e 23).

Na avaliação da manutenção da reatividade dos anticorpos policlonais (IgG – SX) nas preparações imunocitoquímicas, não foi observada diferença significativa entre as diferentes aliquotas de congelamento com tampão PBS 0,05 M, pH 7,4 ou solução contendo glicerol a 10%, tanto no *anti-L.(V.) braziliensis* ($p=0,348$) (Tabela 28) como no *anti-L.(L.) amazonensis* ($p=0,312$) (Tabela 29).

TABELA 26 – ESTABILIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-*L.(V.) braziliensis* EM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (DILUIÇÃO 1/100)

TEMPO CONGELAMENTO (meses)	Ag Solúvel PBS 0,05 M (Abs)	Ag Solúvel GLICEROL 10% (Abs)	Ag Insolúvel PBS 0,05 M (Abs)	Ag Insolúvel GLICEROL 10% (Abs)
0	1,458	1,466	2,029	2,007
1	1,432	1,405	1,956	1,991
2	1,381	1,396	1,825	1,997
3	1,290	1,309	1,687	1,718
4	1,089	1,201	1,668	1,677
5	0,894	0,988	1,421	1,496
6	0,829	0,869	1,266	1,367
7	0,748	0,833	1,098	1,175
8	0,606	0,585	0,903	0,993
9	0,516	0,537	0,684	0,688
10	0,381	0,382	0,423	0,474
11	0,206	0,219	0,307	0,322
12	0,130	0,123	0,152	0,176
Média ± DP	0,843±0,463	0,879±0,465	1,186±0,647	1,237±0,658

Ag = Antígeno; Abs = Absorvância; DP = Desvio-Padrão; $p = 0,161$ (Análise de Variância).

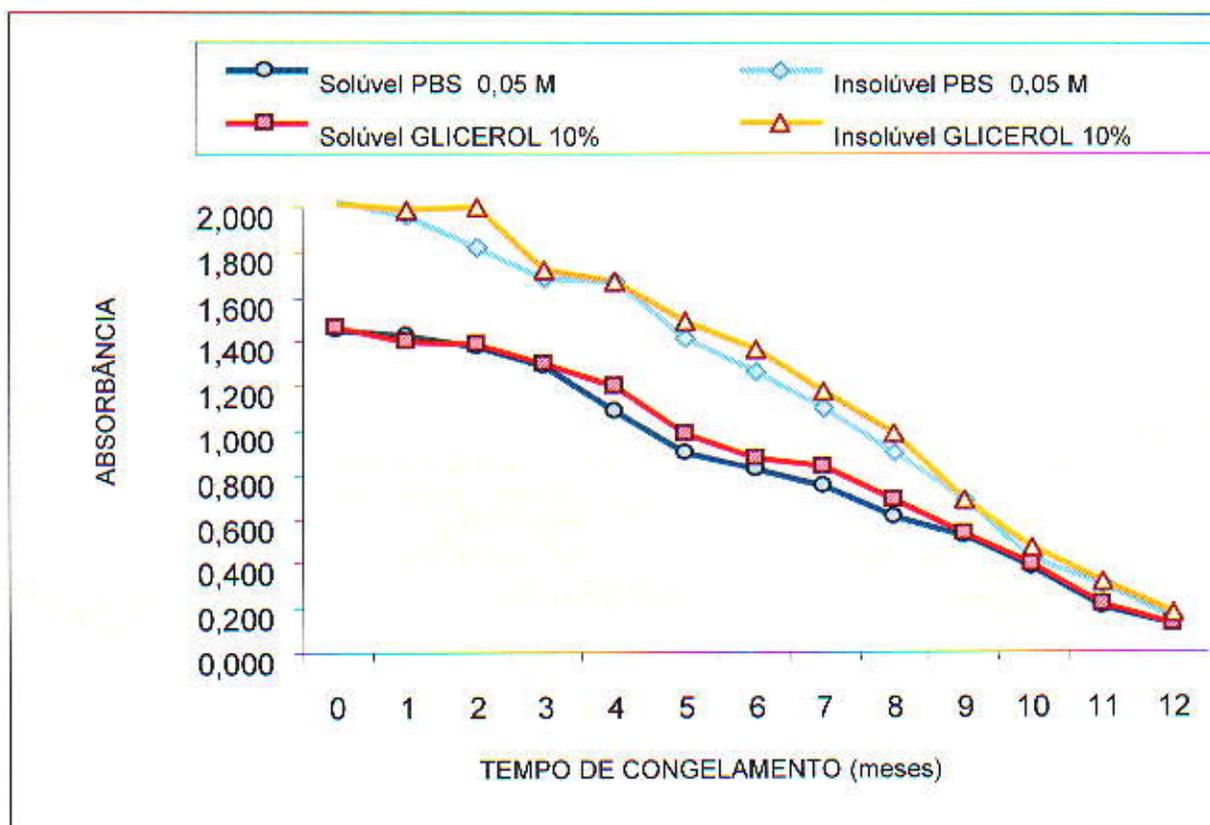


FIGURA 22 – ESTABILIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-*L. (V.) braziliensis* EM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO NA DILUIÇÃO 1/100, AVALIADO NO PERÍODO DE 12 MESES A -20 °C.

TABELA 27 – ESTABILIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-*L. (L.) amazonensis* EM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (DILUIÇÃO 1/100).

TEMPO CONGELAMENTO (meses)	Ag Solúvel PBS 0,05 M (Abs)	Ag Solúvel GLICEROL 10% (Abs)	Ag Insolúvel PBS 0,05 M (Abs)	Ag Insolúvel GLICEROL 10% (Abs)
0	1,042	1,011	1,698	1,753
1	1,044	1,006	1,567	1,762
2	1,021	0,987	1,558	1,665
3	1,002	0,952	1,227	1,383
4	0,923	0,936	1,194	1,236
5	0,882	0,821	1,036	1,224
6	0,785	0,799	0,995	1,259
7	0,626	0,603	0,882	0,988
8	0,554	0,522	0,857	0,969
9	0,418	0,424	0,601	0,717
10	0,327	0,318	0,482	0,505
11	0,216	0,225	0,289	0,303
12	0,115	0,106	0,128	0,151
Média ± DP	0,689±0,334	0,670±0,322	0,963±0,493	1,070±0,531

Ag = Antígeno; Abs = Absorbância; DP = Desvio-Padrão; p = 0,050 (Análise de Variância).

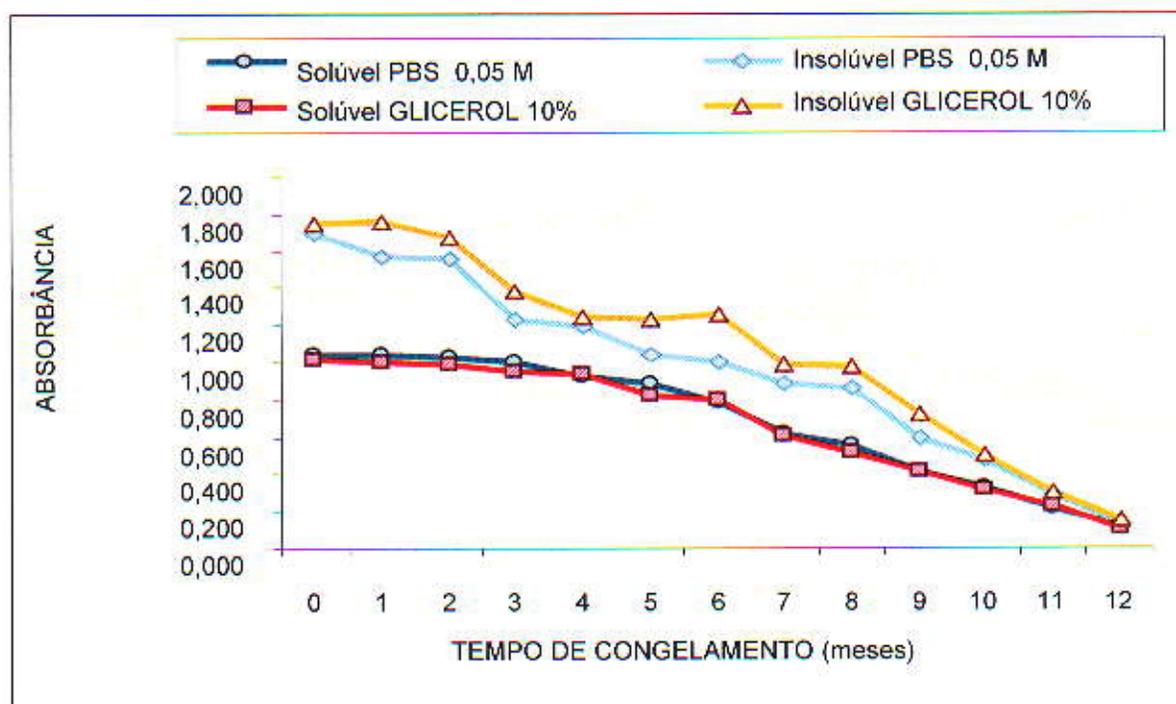


FIGURA 23 – ESTABILIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-*L. (L.) amazonensis* EM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO NA DILUIÇÃO 1/100, AVALIADO NO PERÍODO DE 12 MESES A -20 °C.

TABELA 28 – MANUTENÇÃO DA REATIVIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI- *L. (V.) braziliensis* EM PREPARAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA (DILUIÇÃO 1/100)

TEMPO CONGELAMENTO (meses)	Ag Solúvel			Ag Solúvel			Ag Insolúvel			Ag Insolúvel		
	PBS 0,05 M			GLICEROL 10%			PBS 0,05 M			GLICEROL 10%		
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
0	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
3	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	3+	4+	3+	4+
6	4+	3+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
9	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	4+	4+	3+
10	2+	2+	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	3+
11	1+	1+	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Ag = Antígeno; $p = 0,348$ (Qui-Quadrado).

(*): Presença de coloração inespecífica de fundo (*background*).

TABELA 29 – MANUTENÇÃO DA REATIVIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI- *L. (L.) amazonensis* EM PREPARAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA (DILUIÇÃO 1/100)

TEMPO CONGELAMENTO (meses)	Ag Solúvel			Ag Solúvel			Ag Insolúvel			Ag Insolúvel		
	PBS 0,05 M			GLICEROL 10%			PBS 0,05 M			GLICEROL 10%		
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
0	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
3	4+	3+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
6	4+	3+	4+	4+	3+	3+	4+	3+	4+	4+	4+	4+
9	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	4+	4+	3+
10	2+	2+	2+	2+	1+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	3+
11	1+	1+	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Ag = Antígeno; $p = 0,312$ (Qui-Quadrado).

(*): Presença de coloração inespecífica de fundo (*background*).

5.10 COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE AMASTIGOTAS E ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA*

Na avaliação da ICQ/IHQ em comparação com outras metodologias utilizadas para o diagnóstico da LTA, as preparações de ICQ/IHQ apresentaram maior facilidade de visualização das formas amastigotas em relação às colorações de hematoxilina-eosina (Figura 20 e Tabela 30). Para os casos avaliados a histopatologia com coloração HE apresentou sensibilidade de 33,3% para a detecção de amastigotas, o mesmo resultado observado na ICQ/IHQ. Se for considerada a presença de antígenos de *Leishmania*, no padrão celular, na amostragem avaliada (Figura 26), a ICQ/IHQ apresenta sensibilidade de 83,3%, bastante superior às obtidas com a coloração com HE e compatíveis com os resultados de cultura e PCR (Figura 24), exceto em um possível caso anérgico, que não apresentou antígenos em padrão celular. As metodologias de cultura e PCR foram consideradas como padrão ouro para a comparação com os demais métodos (Tabela 31).

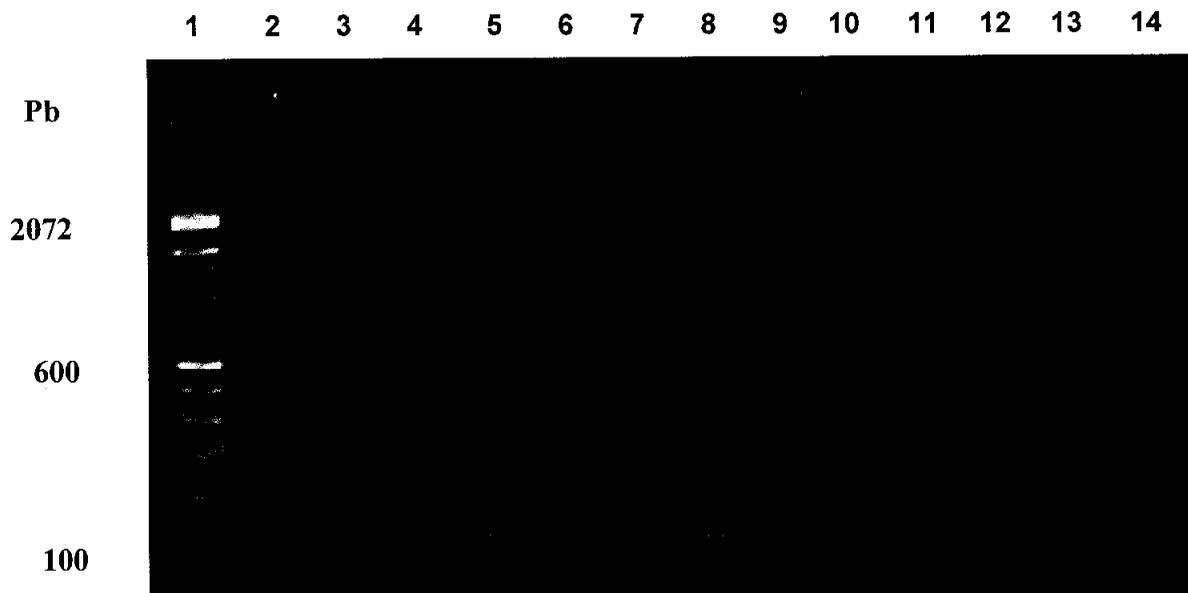
TABELA 30 – HISTOPATOLOGIA PARA PESQUISA DE AMASTIGOTAS DE *Leishmania* EM BIÓPSIAS DE CASOS SUSPEITOS DE LTA, COM COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA-EOSINA. AUMENTO DE 1000X.

CASO	DESCRIÇÃO HISTOPATOLÓGICA	PRESENÇA DE AMASTIGOTAS DE <i>Leishmania sp</i>
1	Inflamação granulomatosa com infecção bacteriana secundária. Sugestivo de Leishmaniose	NEGATIVO
2	Inflamação granulomatosa. Sugestivo de Leishmaniose	NEGATIVO
3	Inflamação granulomatosa "históide" associada à grande quantidade de protozoários, com aspecto de <i>Leishmania sp</i> . (Infecção recente? Estado anérgico?)	POSITIVO
4	Inflamação granulomatosa. Sugestivo de Leishmaniose	NEGATIVO
5	Inflamação granulomatosa. Sugestivo de Leishmaniose	NEGATIVO
6	Leishmaniose. Aspecto histológico sugere infecção experimental, com escassa resposta imune celular. Presença de protozoários com aspecto de <i>Leishmania sp</i> .	POSITIVO

TABELA 31 – COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS PARA A DETECÇÃO DE AMASTIGOTAS E ANTÍGENOS DE *Leishmania* EM MATERIAL DE BIÓPSIAS DE LESÕES.

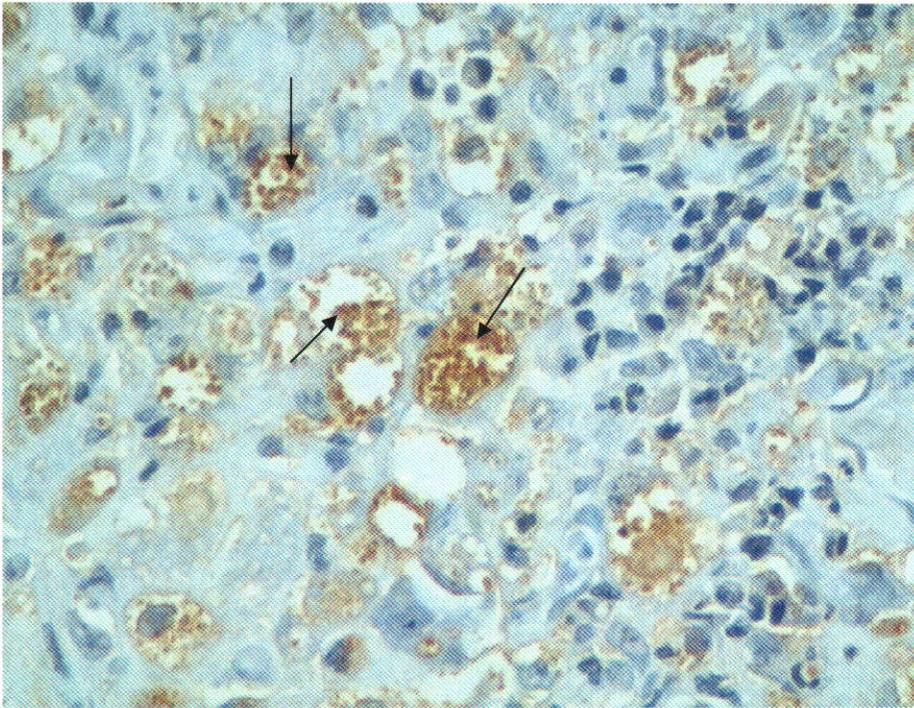
CASO	METODOLOGIA				
	HE PRESENÇA DE AMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i>	IHQ PRESENÇA DE AMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i>	IHQ ANTÍGENOS DE <i>Leishmania</i> PADRÃO CELULAR	PCR	CULTURA
1	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
2	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
3	(+)	(+)	(-)*	(+)	(+)
4	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
5	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
6	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
SENSIBILIDADE (%)	33,3	33,3	83,3	100	100

HE = Histopatologia com coloração de hematoxilina-eosina, aumento 1000x; IHQ = Preparação imunohistoquímica, aumento 1000x; PCR = Reação em cadeia da polimerase.
(*) = (Infecção recente? Estado anérgico?)

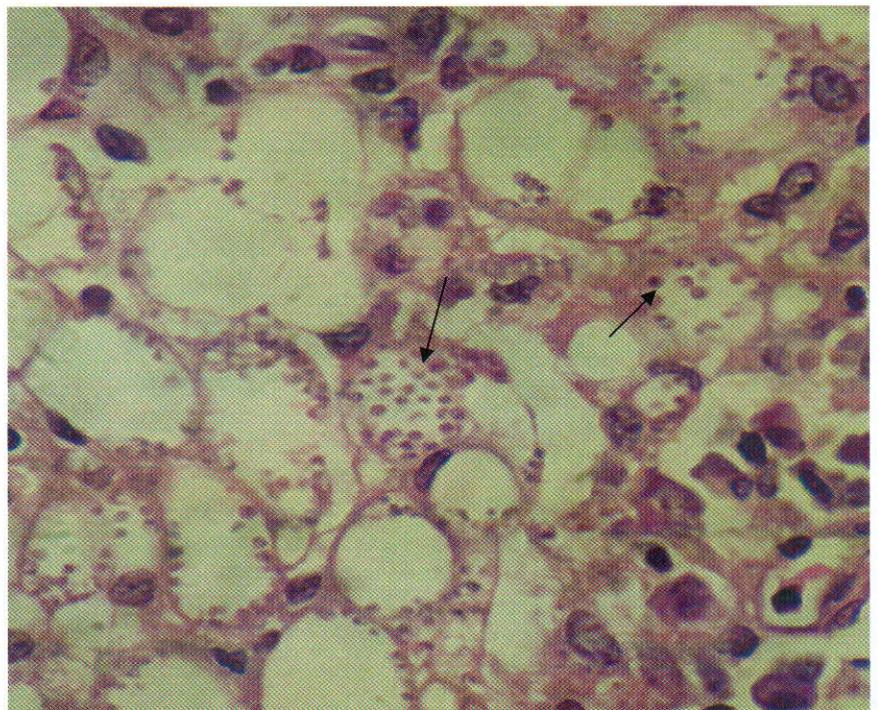


Pb = Pares de base

FIGURA 24 – PERFIL DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DE BIÓPSIAS DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LEISHMANIOSE (LINHAS 2 A 7); DE ANIMAIS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE (LINHAS 8 A 11); CEPA REFERÊNCIA DE *L. (V.) braziliensis* (LINHA 12); *L. (L.) amazonensis* (LINHA 13) E CONTROLE NEGATIVO (LINHA 14). AMPLIFICADOS COM OS INICIADORES b1 E b2. MARCADOR MOLECULAR 100 PB DNA LADDER (INVITROGEN) (LINHA 1)



(A) Preparação IHQ.



(B) Coloração HE.

FIGURA 25 – IMUNOHISTOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICO, COM COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA-EOSINA, DE MATERIAL DE BIÓPSIA PARA DETECÇÃO DE FORMAS AMASTIGOTAS DE *Leishmania*. AUMENTO DE 400X (A) E 1000X (B).

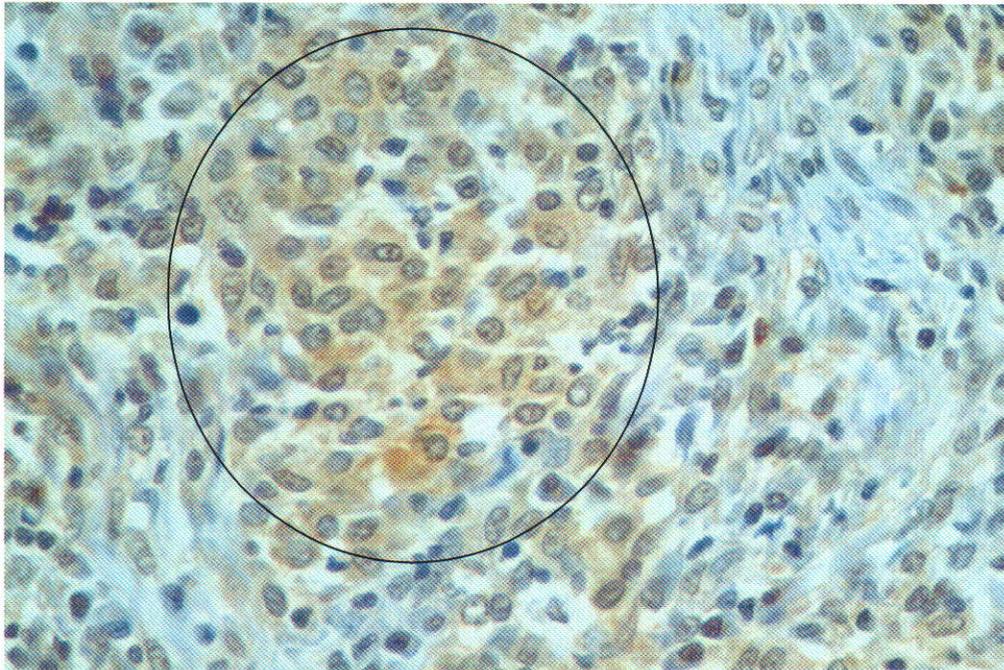


FIGURA 26 – IMUNOHISTOQUÍMICA DE BIÓPSIA DE LESÃO ATIVA DE LTA, COM REAÇÃO POSITIVA PARA ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA* EM CITOPLASMA DE CÉLULAS GIGANTES (PADRÃO CELULAR). AUMENTO DE 1000X.

6 DISCUSSÃO

No período compreendido entre os anos de 1980 e 2006, o número de casos de LTA no Brasil apresentou um crescimento de 4560 para 37.700 casos, chegando a 24.300 casos em 2005 (BRASIL, 2007). O coeficiente de detecção da doença tem apresentado intensa variação de ano para ano nas mesmas localidades e municípios da área endêmica, dificultando a utilização dos métodos tradicionais de estratificação territorial. As mudanças socioeconômicas, ambientais e comportamentais dificultam o controle da doença e vêm permitindo o aumento do número de casos principalmente em populações menos assistidas pela estrutura sanitária dos estados e municípios. Um exemplo típico é o processo de periurbanização e urbanização das leishmanioses, intimamente associadas às modificações decorrentes do êxodo rural, desemprego e favelização, freqüentemente observados no Brasil (BRASIL, 2007).

Os métodos de diagnóstico atualmente disponíveis para LTA apresentam, em diversos aspectos, restrições que limitam sua eficácia e possibilidades de aplicação nos serviços de saúde e principalmente em locais distantes dos grandes centros onde geralmente estão os pacientes (FABER *et al.*, 2003). O diagnóstico clínico, nas formas típicas da doença, nas quais a lesão é evidente e a história clínica é exuberante, pode ser feito sem dificuldade por um profissional experiente. Porém, deve ser realizado o diagnóstico diferencial de outras dermatoses granulomatosas, que apresentam lesões semelhantes à LTA e que podem ser confundidas, podendo levar a erro de diagnóstico e acarretando conseqüências negativas para o paciente e o sistema de saúde (REED, 1996). Na pesquisa direta do parasito nas lesões, a porcentagem de positividade é inversamente proporcional à duração da infecção, sendo que, em lesões recentes, as formas amastigotas podem ser encontradas com maior facilidade. Em lesões crônicas, as amastigotas são escassas e geralmente raras após um ano, requerendo maior dedicação e experiência do microscopista, não sendo raros os casos falsos negativos. Lesões muito contaminadas também contribuem para diminuir a sensibilidade do método (CUBA, 2000; SINGH & SIVAKUMAR, 2003). Os sistemas de diagnóstico imunológico que utilizam métodos de enzima-imunoensaio (ELISA), imunofluorescência indireta (IFI), pesquisa de DNA e cultura necessitam de uma estrutura técnica

laboratorial que nem sempre é disponibilizada nos serviços de saúde pública nos municípios do interior, ficando restritos aos centros de referência (SINGH & SIVAKUMAR, 2003). Os métodos para avaliação da resposta celular (teste de Montenegro) apresentam limitações em sua padronização, além da dificuldade no retorno do paciente para a realização da leitura da reação, após 72 horas (SOUZA *et al.*, 1992). Na rotina dos serviços de saúde que oferecem apoio técnico para o diagnóstico laboratorial da LTA, a pesquisa do parasita é a opção mais rápida e comumente disponível. O exame histopatológico e o esfregaço de material de lesões, corados por hematoxilina-eosina e Giemsa, apresentam limitações caracterizadas pela dificuldade de visualização do parasita. Estes aspectos limitantes, já apresentados no item 3.7.2.1, têm estimulado o desenvolvimento e a aplicação da metodologia de ICQ/IHQ no diagnóstico da LTA (WEIGLE *et al.*, 1987).

Neste contexto, é justificado o desenvolvimento de um método ICQ/IHQ para complementar o conjunto de metodologias disponíveis, visando melhorar o diagnóstico e o coeficiente de detecção da LTA. Assim, a etapa inicial deste trabalho consistiu na produção de antígenos solúvel e insolúvel de *Leishmania*. Buscando elevar o índice de positividade diagnóstica, permitindo maior abrangência na aplicação da metodologia, foram produzidos antígenos a partir das espécies de *Leishmania* mais comumente envolvidas nos casos de LTA no Brasil. As espécies pertencentes a subgêneros distintos apresentam especificidades morfológicas, bioquímicas e em formas clínicas, sendo que *L. (L.) amazonensis* é responsável pela manifestação cutânea e cutâneo-difusa e a *L. (V.) braziliensis* pela apresentação das formas cutânea e cutâneo-mucosa da doença. Além disso, a escolha destas espécies deve-se ao fato de serem as que possuem maior distribuição geográfica (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993).

Ainda no aspecto da abrangência da metodologia e com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a aplicabilidade do método, optou-se pela utilização de anticorpos policlonais, considerando que atendem aos requisitos técnicos de ICQ/IHQ, elevam a sensibilidade diagnóstica e são mais acessíveis, técnica e economicamente, que os anticorpos monoclonais (TAFURI, 2004). Outra vantagem, na aplicação dos anticorpos policlonais em IHQ para o diagnóstico de doenças infecto parasitárias, é que os anticorpos monoclonais apresentam atividade para apenas um epítipo antigênico, que

pode não resistir ao processamento histopatológico com fixação em formol e parafina (BANCROFT & COOK, 1994), o que diminuiria sua sensibilidade.

Os antígenos produzidos a partir da cultura de formas promastigotas das cepas de referência MHOM/BR/75/M2903 de *L. (V.) braziliensis* e MHOM/BR/78/PH8 de *L. (L.) amazonensis* apresentaram concentração de proteínas, volume e biomassa com resultados similares (Tabelas 2 e 3), não sendo observada diferença significativa, em termos de produção, entre os mesmos tipos de antígenos das diferentes espécies. A determinação de proteínas pelo método de Bradford (1976) não foi aplicada aos antígenos insolúveis por serem constituídos de material particulado, o que causaria interferência na determinação da absorbância do produto colorido resultante. Para estes antígenos foi aplicado o método de micro Kjeldahl (A.O.A.C., 960.52, 1995 – modificado), com determinação de nitrogênio total e conversão para percentual de proteínas na biomassa resultante (Tabela 3).

A cinética de produção de anticorpos, a partir da imunização de animais, indicou que o ápice ocorreu aos 65 dias após o início da sensibilização, sendo realizada a sangria de produção neste período (Tabelas 4 e 5). Na análise comparativa dos resultados obtidos na determinação imunoenzimática, foi observado que os antígenos insolúveis, de ambas as espécies de *Leishmania*, apresentaram absorbâncias significativamente superiores aos antígenos solúveis, indicando maior imunogenicidade. Este resultado apresenta relevância para o estudo, pois indica que a opção pela utilização de antígenos insolúveis para a imunização de animais e produção de soros hiperimunes resultará em melhor rendimento para o processo produtivo e maior reatividade. Os resultados obtidos mostraram não haver diferença significativa entre as espécies do parasito para os mesmos tipos de antígenos.

Na aplicação das metodologias de ICQ e IHQ, a ocorrência de reações inespecíficas de fundo (*background*) deve ser evitada, pois pode comprometer a avaliação da presença de determinado antígeno na amostra em análise. As reações inespecíficas são devidas à existência de interações hidrofóbicas, iônicas, atividades enzimáticas endógenas, fixação deficiente, degradação da amostra e presença de anticorpos naturais e proteínas contaminantes (BOENISCH, 2001; BORGES-FERRO, 2005). A maioria dos interferentes pode ter sua atividade atenuada ou eliminada nas

etapas de execução da metodologia. A interferência devido a proteínas contaminantes, presentes nos soros hiperimunes, pode ser minimizada por um processo eficiente de purificação dos soros. Neste trabalho, o processo de purificação consistiu na extração de imunoglobulinas, segundo a metodologia de Mckinney & Parkinson (1987), seguido de purificação cromatográfica em coluna, conforme descrito em material e métodos.

Os resultados da determinação protéica das frações de imunoglobulinas purificadas (IgG - SA) (Tabela 6) não apresentaram modificações nos perfis obtidos anteriormente para os soros hiperimunes (HPI), sendo mantida a proporção da concentração protéica para as imunoglobulinas obtidas a partir das imunizações com os diferentes antígenos de *Leishmania sp.*

A manutenção da atividade das imunoglobulinas, extraídas pelo tratamento com sulfato de amônio, foi confirmada por reação imunoenzimática, que também indicou maior imunorreatividade para os anticorpos policlonais produzidos a partir dos antígenos insolúveis, particularmente quando utilizada a diluição de 1/200, que apresentou a maior diferença (Tabela 7).

As frações de imunoglobulinas submetidas ao processo de purificação cromatográfica em coluna, utilizando-se resina de G - sepharose (Sephadex®), apresentaram resultados de concentração protéica (Tabela 8) próximos aos obtidos nas etapas anteriores. O resultado da atividade das IgG purificadas (IgG - SX), avaliada por enzimaímunoensaio, também indicou a maior reatividade para aquelas produzidas a partir dos antígenos insolúveis (Tabela 9).

A metodologia de enzimaímunoensaio, utilizada para a determinação da cinética de produção de anticorpos e atividade dos soros hiperimunes (HPI) e anticorpos policlonais (IgG - SA e IgG - SX), além de permitir uma padronização metodológica e verificação da atividade e especificidade das imunoglobulinas, possibilitou uma avaliação quantitativa da imunorreatividade. Deve ser observado que na padronização do teste de ELISA foram utilizados antígenos solúveis para a sensibilização das placas, pois o insolúvel ocasionaria interferência na determinação da absorbância, por ser constituído de material particulado. A maior reatividade apresentada pelos soros e imunoglobulinas obtidos a partir de antígenos insolúveis indica a existência de reação cruzada entre os anticorpos produzidos e os antígenos utilizados na sensibilização das

placas. Esta característica, além de não comprometer a interpretação dos dados, sugere que a aplicação dos anticorpos policlonais, produzidos a partir de antígenos insolúveis, possibilita um espectro mais amplo de reatividade, sendo favorável para utilização na ICQ / IHQ.

Buscando estabelecer as condições técnicas apropriadas para a obtenção de resultados satisfatórios na metodologia de ICQ, foram avaliadas as condições de aderência, fixação e conservação das amostras em lâminas (Tabelas 10 a 17). Estes parâmetros devem proporcionar a manutenção das características originais da amostra, sendo representativas do tecido pesquisado, diminuindo os casos de falsos negativos decorrentes de condições impróprias de conservação e fixação. Além de proporcionar as condições técnicas adequadas, os parâmetros devem ser de fácil execução, sem necessidade de estrutura técnica sofisticada, permitindo sua aplicação em todos os níveis de assistência à saúde. Para os cortes de tecido submetidos à metodologia de IHQ, o procedimento histopatológico convencional, já estabelecido na prática laboratorial (BANCROFT & COOK, 1994), que inclui a conservação da amostra em formol tamponado a 10% e a confecção de blocos de parafina para cortes histológicos, atende aos requisitos de fixação e conservação exigidos.

Os parâmetros foram avaliados frente a distensões esfregaços por aposição contendo formas promastigotas e amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, não apresentando diferença significativa nos resultados obtidos.

Na avaliação dos tipos de lâminas de vidro (comuns ou silanizadas), que apresentam as condições de aderência e fixação adequadas ao processo, não houve diferença significativa nos resultados apresentados, indicando não haver necessidade do tratamento prévio das lâminas comuns com 3 – aminopropil – trietoxissilano (silano). Apesar do uso de lâminas silanizadas ter sido sugerido em informes técnicos dos fabricantes do sistema de detecção (BOENISCH, 2001), a opção pelas lâminas comuns busca, além de atender requisitos técnicos básicos, estabelecer condições que não dificultem ou onerem a realização da metodologia em laboratórios de pequeno porte e com estrutura deficiente.

Com a mesma finalidade apresentada anteriormente, foi avaliado o efeito do soro fetal bovino (SFB) sobre as amostras submetidas a *imprints* e esfregaços. A adição de

solução protéica tem sido utilizada em métodos citológicos com o objetivo de aumentar a aderência das amostras de tecidos às lâminas, bem como preservar aspectos morfológicos. Os resultados obtidos demonstraram que a adição de SFB não apresentou efeitos significativos à aderência e conservação dos parasitos, nos experimentos realizados, indicando não haver necessidade deste procedimento adicional na obtenção de condições satisfatórias para a ICQ.

Dos parâmetros preliminares avaliados, as variáveis de fixação à seco e secagem parcial ao ar (1 minuto e 10 minutos) com fixação em etanol a 95%, não apresentaram resultados com variações significativas. Na avaliação destes parâmetros, optamos pela utilização de etanol a 95%, considerando ser de fácil aquisição e apresentar menor toxicidade que o metanol (LEITE, 1992), não necessitando a utilização de capelas de exaustão ou equipamentos de proteção individual, apresentando resultados similares.

Em função dos resultados obtidos e com a finalidade de estabelecer os parâmetros que apresentem ao mesmo tempo condições satisfatórias de aderência, preservação morfológica e facilidade de execução, entendemos que a metodologia que estabelece o uso de lâminas comuns, sem adição de SFB, secagem ao ar por 10 (dez) minutos e fixação em etanol a 95%, atende as condições técnicas necessárias para a obtenção de resultados satisfatórios na metodologia de ICQ.

Aplicando os parâmetros preliminares anteriormente definidos as distensões, esfregaços por aposição e seções de tecido foram submetidos aos processos de ICQ e IHQ, utilizando-se os anticorpos primários obtidos nas diferentes etapas de purificação e frente às duas espécies de *Leishmania*. Os resultados apresentados indicaram que os parâmetros preliminares foram adequados, com aderência e preservação morfológicas satisfatórias. Na avaliação das diluições dos anticorpos foram testadas as diluições de 1/10, 1/100 e 1/1000. As lâminas preparadas com diluições de 1/10 apresentaram elevada ocorrência de reações inespecíficas de fundo (*background*), não permitindo a utilização desta diluição nas preparações. As diluições de 1/1000, em alguns casos, apresentaram baixa imunorreatividade, o que impede sua aplicação segura em análise diagnóstica. Em função disto, optou-se pela utilização das diluições de 1/100, por apresentarem resultados adequados para aplicação em preparações ICQ/IHQ.

A imunorreatividade das imunoglobulinas em diferentes etapas de purificação foi avaliada considerando a intensidade de coloração desenvolvida nas preparações ICQ/IHQ. Os resultados apresentados nas Tabelas 18 a 21 e Figuras 12 a 19 indicaram maior reatividade para as imunoglobulinas produzidas a partir dos antígenos insolúveis e com maior grau de tratamento e purificação (IgG - SX). Pode ser observado pela análise de variância e pela aplicação do teste de comparações múltiplas (teste de Tukey) que o aumento da reatividade é diretamente relacionado com o grau de purificação, ou seja, os anticorpos policlonais obtidos após purificação cromatográfica em coluna de SEPHADEX® (IgG - SX), apresentaram maior imunorreatividade que as imunoglobulinas somente extraídas com sulfato de amônio (IgG - SA) que por sua vez apresentaram resultados superiores aos soros hiperimunes (HPI). Esses resultados são compatíveis com os obtidos quando foi aplicada a metodologia de enzimaensaio para avaliação da atividade das imunoglobulinas purificadas (Tabela 9). A maior imunorreatividade dos anticorpos policlonais (IgG - SA e IgG - SX), obtidos a partir de antígenos insolúveis, observada tanto no método de ELISA quanto na metodologia de ICQ/IHQ, aliada ao melhor rendimento na imunização de animais e produção de soros hiperimunes (HPI) (Tabelas 4 e 5), obtidos neste trabalho, indicam a utilização de antígenos insolúveis para a produção de anticorpos policlonais.

A avaliação da reatividade das imunoglobulinas obtidas a partir de antígenos de *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis* frente a parasitas de espécie distinta (Tabelas 22 e 23) indicou não haver diferença significativa, ou seja, os anticorpos não são espécie-específicos. Todavia, essa característica não compromete a aplicação dos anticorpos policlonais produzidos ou a metodologia de ICQ/IHQ, considerando que o objetivo é implementar o diagnóstico da doença e não sua aplicação em estudo epidemiológico ou filogenético. Esta característica pode ser bastante favorável, pois amplia a aplicação da metodologia e dos anticorpos policlonais para áreas com prevalência de LTA causada por outras espécies de *Leishmania*.

Nos resultados em que foram avaliadas as quantidades de parasitos fixados nas lâminas e a integridade morfológica (Tabelas 18 a 23), não foi observada diferença significativa, indicando não haver interferência do grau de purificação ou origem dos anticorpos policlonais na fixação dos parasitos nas lâminas e na manutenção da

morfologia.

Na avaliação da imunorreatividade e especificidade dos anticorpos, foi observada a ocorrência de reações inespecíficas de fundo (*background*), especialmente quando são utilizados soros hiperimunes (HPI) (Tabelas 18 a 25). O uso de anticorpos policlonais purificados (IgG – SX) eliminou ou atenuou a ocorrência desta interferência, indicando que é indicada sua utilização na metodologia de ICQ/IHQ. Apesar de o processo de purificação ser de custo relativamente elevado, a atenuação das reações inespecíficas de fundo, já discutida anteriormente, é fundamental para a obtenção de resultados confiáveis na metodologia.

Na avaliação da especificidade dos soros hiperimunes (HPI) e anticorpos policlonais (IgG – SA e IgG – SX), os resultados obtidos na análise das preparações ICQ apresentados nas Tabelas 24 e 25 e exemplificados pela Figura 20, pode ser evidenciada a ausência de reação imunocitoquímica frente aos microrganismos não pertencentes à família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*, indicando especificidade de 100% nestas amostras. A escolha dos microrganismos para verificação da especificidade considerou os encontrados com maior frequência como contaminantes em lesões *leishmanióticas* ou os que desenvolvem lesões similares ou ainda para verificação de reações cruzadas entre espécies do mesmo gênero ou ordem. A especificidade dos anticorpos obtidos, revelada pela coloração específica desenvolvida, favorece a visualização dos parasitas pesquisados pela ICQ (Figura 20) se comparado com a coloração de MayGrunwald - Giemsa (Figura 21).

Foram observadas reações cruzadas entre *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*. As reações cruzadas entre os diferentes anticorpos e as espécies de *Leishmania* indicaram a possibilidade da aplicação destes anticorpos em ICQ e IHQ em regiões que apresentem casos de qualquer uma das espécies em estudo, sendo favorável ao aumento da abrangência do método. A reação cruzada com *Trypanosoma cruzi* não compromete a metodologia, pois não se espera a presença deste parasita em lesões com características *leishmanióticas*, considerando que o método é baseado em visualização dos parasitas ou antígenos específicos nestas amostras biológicas. A ocorrência de reações cruzadas também é observada nos métodos de diagnóstico sorológicos (IFI e ELISA), especialmente com a doença de

Chagas e calazar, comprometendo, em parte, a especificidade daqueles métodos. As metodologias sorológicas apresentam resultados variáveis na LTA, quer pela reduzida antigenicidade do parasita ou pelos baixos níveis de anticorpos circulantes. Além disso, o número de reações sorológicas negativas é maior entre os casos com exame parasitológico positivo quando comparado àqueles em que a pesquisa direta do parasito foi negativa (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

A manutenção da atividade imunológica dos anticorpos policlonais (IgG – SX) congelados a -20°C foi avaliada conforme descrito no item 4.14 e os resultados apresentados nas Tabelas 26 a 29. A avaliação da estabilidade foi realizada somente para os anticorpos policlonais (IgG – SX) por terem sido escolhidos para aplicação na metodologia, em função das vantagens técnicas já discutidas. A escolha da temperatura de congelamento em -20°C considerou a disponibilidade, em laboratórios de pequeno porte, de equipamentos que atinjam esta temperatura, apesar de o congelamento a -80°C permitir a manutenção da reatividade por períodos mais longos. Para aplicação neste estudo, foi estabelecido que a estabilidade refere-se à manutenção das propriedades para aplicação em ICQ/IHQ, com desenvolvimento de coloração com intensidade mínima quantificada em (2+). Para obtenção desta intensidade de cor, observou-se para anticorpos policlonais anti-*L. (V.) braziliensis* uma absorvância de 0,381 para antígeno solúvel e 0,307 para antígeno insolúvel, respectivamente no 10º e 11º mês de congelamento. Para anticorpos anti-*L. (L.) amazonensis* foi encontrada absorvância de 0,337 para antígeno solúvel e 0,289 para o insolúvel, no mesmo período de congelamento. Na avaliação da atividade imunológica dos anticorpos policlonais submetidos ao congelamento, não foi observada diferença significativa entre as espécies ou para alíquotas congeladas em tampão PBS 0,05 M, pH 7,4 ou em solução contendo glicerol a 10%.

Os dados obtidos no desenvolvimento e padronização, discutidos anteriormente, permitiram o estabelecimento de condições metodológicas para a ICQ/IHQ, com parâmetros adequados à proposta de utilização em laboratórios voltados ao diagnóstico de LTA.

As técnicas de IHQ têm sido eficientes no diagnóstico da LTA, principalmente por permitirem uma melhor visualização do parasita, evidenciando sua presença em

amostras de lesões com restos celulares e microrganismos contaminantes (KENNER *et al.*, 1999). Em adição à identificação de amastigotas Integras em lesões ativas de LTA, a metodologia de IHQ pode ser aplicada também em lesões cicatriciais, permitindo verificar a presença de amastigotas degradados ou em fase de processamento de antígenos. A presença dos antígenos pode ser classificada em padrões celulares, vasculares e neurais, dependendo da localização (SCHUBACH *et al.*, 2001).

Além da viabilidade da aplicação em serviços de pequeno porte, a metodologia fornece parâmetros que contribuem para a fundamentação do diagnóstico laboratorial. Na avaliação dos diferentes métodos utilizados para o diagnóstico laboratorial da LTA descrito nos itens 4.15 e 5.10 e resultados apresentados nas Tabelas 30 e 31 e Figuras 20, 21, 25 e 26, pode ser observado que a metodologia de IHQ apresenta algumas possibilidades adicionais para o diagnóstico da LTA em relação à metodologia tradicional de histopatologia com coloração por hematoxilina-eosina (HE), que apresentou sensibilidade de apenas 33,3%, compatível com resultados encontrados na literatura (SCHUBACH *et al.*, 2001; KENNER *et al.*, 1999). Uma vantagem relevante da IHQ em relação a histopatologia com HE é a facilidade de observação das formas amastigotas em um campo de microscopia que apresente poucos parasitas em meio à reação inflamatória, restos celulares (*debris*) e microrganismos contaminantes (infecções secundárias). Esta visualização ampliada é decorrente da presença bem definida do substrato cromogênico (DAB) no sítio de interação antígeno-anticorpo, em contraste com o corante de fundo, possibilitando sua visualização mesmo por um patologista ou microscopista com pouca experiência no diagnóstico de LTA. Além desta vantagem na coloração, o substrato cromogênico permite um delineamento das estruturas das formas amastigotas, dando aparência maior do que na coloração por HE (de 3-5 μm contra 2-4 μm , respectivamente). Outro aspecto relevante refere-se à necessidade de uso de objetivas de imersão na microscopia de preparações histopatológicas coradas por HE, sendo dispensável na IHQ. Estas possibilidades de visualização permitem uma redução no tempo de análise microscópica para o diagnóstico da LTA (KENNER *et al.*, 1999).

Outra informação obtida na ICQ/IHQ é a possibilidade da presença de reação positiva para antígenos de *Leishmania*, que ocorre em tecidos com parasitas

parcialmente degradados ou em fase de processamento de antígenos (Figura 26), independente da visualização das formas amastigotas íntegras. Em estudo realizado por SCHUBACH *et al.* (2001), os autores classificam os antígenos em quatro padrões distintos: padrão amastigota, para formas íntegras; padrão celular, para antígenos processados no citoplasma de células fagocitárias; padrão vascular, para localização na parede de vasos sanguíneos e padrão neural, para localização em nervos periféricos (derme). Essa classificação é particularmente importante em lesões pobres em parasitas, pois indica a possível presença de antígenos de *Leishmania* na amostra, sugerindo a necessidade de uma análise microscópica mais exaustiva ou a aplicação de uma metodologia mais sensível para a confirmação diagnóstica, evitando a ocorrência de um diagnóstico falso negativo e suas conseqüências para o paciente. Esta possibilidade de caracterização de antígenos, independente da presença de amastigotas íntegras, elevou a sensibilidade da metodologia neste estudo para 83,3 % (Tabela 31). Considerando que nos casos onde foram identificadas formas amastigotas (coloração HE), o diagnóstico já estava definido, a presença de antígenos de *Leishmania* caracterizado em todas as demais amostras, com confirmação diagnóstica por PCR e cultura, eleva a sensibilidade do método para 100% dos casos avaliados. Este resultado é compatível com a sensibilidade de 92,5% encontrada por SCHUBACH *et al.* (2001), oferecendo um parâmetro adicional para o estabelecimento do diagnóstico.

Este conjunto de vantagens tem permitido que a IHQ apresente maior sensibilidade e especificidade para a detecção de amastigotas e antígenos em lesões ativas de LTA, quando comparado com análise histopatológica com coloração por HE (LIVNI *et al.*, 1983; SALINAS *et al.*, 1989; KENNER *et al.*, 1999).

Os métodos histopatológicos para diagnóstico da leishmaniose geralmente apresentam resultados conflitantes. Num estudo realizado para zona endêmica de *L. (V.) braziliensis*, Magalhães *et al.* (1986) encontraram positividade para 63,7% dos casos de leishmaniose cutânea e 37,5% para pacientes com lesões de mucosa. Já Ridley (1980), avaliando pacientes de diferentes partes do mundo, onde a leishmaniose é endêmica, observou baixa sensibilidade para o método. Em histopatologia, geralmente o padrão de reação exsudativa celular constitui o quadro inicial e final da

lesão, com os demais padrões aparecendo interpostos durante a evolução da doença. O diagnóstico histopatológico de certeza da leishmaniose cutânea só é possível mediante o achado dos parasitos. Na maioria das vezes, as alterações histopatológicas são sugestivas do diagnóstico. Assim, os insumos ora produzidos poderão aumentar a sensibilidade da técnica, disponibilizando para os patologistas e serviços laboratoriais ferramentas que possam auxiliar no diagnóstico desta grave doença.

Entre as perspectivas de estudos a serem conduzidos para implementar a metodologia e os insumos desenvolvidos neste trabalho, entendemos que o aumento da estabilidade dos anticorpos policlonais e a aplicação de sistemas de revelação com polímeros, em substituição ao complexo estreptavidina-biotina, são os de maior relevância. Como opções para o aumento da estabilidade, podem ser avaliados os processos de liofilização dos anticorpos policlonais e a utilização de agentes conservantes antibacterianos e soluções protéicas, como azida sódica a 0,1% e albumina bovina 0,1%. No sistema de revelação, pode ser avaliada a aplicação de polímeros pelo método direto (*EPOS*®) e indireto (*ENVISION*® e *PICTURE*®). Estes sistemas são constituídos por macromoléculas, principalmente dextrano, onde são conjugadas grandes quantidades de anticorpos secundários (método indireto) e moléculas propiciadoras de visualização (marcadores), como a peroxidase e a HRP (*horseradish peroxidase*). Estes métodos oferecem como vantagem a grande ampliação da imagem devida à elevada concentração de anticorpos e marcadores em sítios específicos. Todavia, apresentam como desvantagem o elevado custo.

As ações de controle da leishmaniose tegumentar americana devem ser alvo de uma programação contínua, que tenham como objetivo o diagnóstico do doente. Para isto torna-se necessário o fornecimento de insumos para o diagnóstico complementar, além da investigação de focos com adequado registro de sua ocorrência, orientação terapêutica padronizada e adoção de medidas profiláticas pertinentes. Neste sentido o presente trabalho traz a contribuição e disponibilização de mais uma ferramenta diagnóstica para LTA a ser usada no sistema de saúde pública.

7 CONCLUSÕES

1. Os antígenos solúveis e insolúveis produzidos a partir de culturas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* apresentaram antigenicidade capaz de sensibilizar os coelhos e produzir soros hiperimunes. Os antígenos insolúveis, de ambas as espécies, apresentaram maior imunogenicidade que os solúveis.
2. Os anticorpos policlonais contra *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, produzidos e purificados segundo o procedimento descrito, apresentaram sensibilidade, especificidade e estabilidade adequadas para utilização em ICQ/IHQ. Os anticorpos policlonais com maior grau de purificação (cromatografia em coluna de SEPHADEX®) apresentaram maior imunorreatividade nas preparações ICQ/IHQ.
3. As condições de fixação (secagem ao ar 10 minutos e etanol a 95 %), tipos de lâminas (simples), diluição(1/100) e anticorpos policlonais purificados, estabelecidos neste trabalho atendem aos requisitos técnicos das metodologias de ICQ/IHQ.
4. As metodologias de ICQ/IHQ foram capazes de demonstrar, em amostras de culturas *in vitro*, infecções experimentais em animais e em lesões suspeitas de LTA em humanos, a presença de formas promastigotas, amastigotas e antígenos de *Leishmania*.
5. O sistema diagnóstico, composto pelos anticorpos policlonais e o complexo avidina – biotina modificado (Ultra Streptavidin®) apresentou especificidade de 100% frente aos microorganismos testados não pertencentes à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida.
6. O método diagnóstico desenvolvido neste trabalho, baseado em ICQ/IHQ, oferece parâmetros adicionais para auxiliar na identificação etiológica da Leishmaniose Tegumentar Americana, sendo de fácil execução e interpretação, podendo ser utilizado em serviços do sistema público de saúde.

REFERÊNCIAS

- AKUFFO, H. *et al.* *In vivo* evaluation of immune responses in leishmaniasis: the use of cross-species leishmanin preparations for skin testing. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53: 16-22, 1995.
- AMERSHAM BIOSCIENCES. **Antibody purification handbook**. Piscataway: Pharmacia & Upjohn, 2002.
- ANTOINE, J.C; LANG, P; PRINA, E. Biologie cellulaire des *Leishmania*. [Cell biology of *Leishmania*] In: DEDET, J. P. (Ed.). **Les leishmanioses [The leishmaniasis]**. Paris: Elipses, 33-50, 1999.
- A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. USA: ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, Washington D.C. 1995.
- ARIAS, E. Z. J. *et al.* **Leishmaniasis epidemiology and control in the Americas, by country and territory**. Organizacion Panamericana de la Salud, 52 p. ilus. (OPS. Cuaderno Tecnico 44). Washington, D.C, 1996.
- ASHFORD, R. W.; DESJEUX, P.; DE RAADT, P. Estimation of population at risk of infection with leishmaniasis. **Parasitology Today**, v. 8: 104-105, 1991.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, v. 30: 1269 -1281, 2000.
- AZULAY, R. D.; AZULAY JR., D. R. Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 34: 303-307, 1995.
- BANCROFT, J. D.; COOK, H. C. **Manual of Histological Techniques and their Diagnostic Application** – 2. ed. Churchill Livingstone, 1994.
- BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; TIBAYRENC, M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. **Internacional Journal of Parasitology**, v. 29: 1137-1147, 1999.
- BARRAL, A. *et al.* Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44: 536-546, 1991.
- BARRAL-NETTO, M. *et al.* Transforming Growth-Factor-Beta In Leishmanial Infection - A Parasite Escape Mechanism. **Science**, v.257: 545-548, 1992.
- BARRET, J. **Textbook of Immunology and introduction to immunochemistry and**

immunobiology – 5. ed. The C. V. Mosby Company, 1988.

BERMAN, J. D. Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Clinical Dermatology**, v. 14: 519-522, 1996.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24: 684-703, 1997.

BOENISCH, T. *et al.* **Handbook of immunochemical staining methods**. 3. ed. Dako Corporation, 2001.

BOMFIM, G. *et al.* Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 84: 188-194, 1996.

BORGES-FERRO, A. **Técnicas Imunocitoquímicas (2005)**. Disponível em: <<http://www.amadeuferro.pt.vu/>>. Acesso em: 17/03/2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72: 248 – 254, 1976.

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. Disponível em: <<http://www.portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 02/04/2007.

BROWN, S. B. **Ultraviolet and visible spectroscopy. An introduction to spectroscopy to biochemists**. London: Academic Press, p.14-69, 1980.

CASTILLO, C. M.; ROJAS, C. Evaluation of popular stains for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92: 531-532, 1997.

CASTILHO, T. M.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41: 540-546, 2003.

CASTRO, E. A. de. **Aspectos epidemiológicos e parasitológicos da leishmaniose tegumentar em duas regiões do estado do Paraná e o papel do cão na manutenção do ciclo de *Leishmania***. 188 f. (Doutorado em Ciências - Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

CASTRO, E. A. *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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35 (5): 445-452, 2002.

CASTRO, E. A. *et al.* Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira River Valley, Paraná State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 93: 141-149, 2005.

CHIARI, C. A.; MAYRINK, W.; MAGALHÃES, P. A. Reação de Imunofluorescência Indireta no controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 15: 298-303, 1973.

CONVIT, J. *et al.* The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 87: 444-448, 1993.

COONS, A. H. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *Journal of Immunology*, 1941.

COUTINHO, S. G. *et al.* T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Experimental Parasitology*, v. 84: 144-155, 1996.

CUBA, C. C. A. Diagnóstico Parasitológico de la *Leishmaniosis* Tegumentária Americana. *Revista de Medicina Experimental*, v. 17: 1-4, 2000.

CUPOLILLO, E. *et al.* A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today*, v. 16: 142-144, 2000.

DA CRUZ, A. M. *et al.* T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9: 251-256, 2002.

DEDET, J. P. *et al.* The Parasite. *Clinics in Dermatology*, Norfolk, v. 17: 261-268, 1999.

DEF – DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS. *Jornal Brasileiro de Medicina*. Editora de Publicações Científicas Ltda., 2006.

DE LUCA, P. M. *et al.* Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine*, v. 17: 1179-1185, 1999.

DESJEUX, P. Aspects de Santé publique et lutte. In: DEDET, J. P. *Les Leishmanioses*. Paris: Aupelf-Ureff- Ellipses, p. 219-238, 1999.

ENGVALL, E.; PERLAMANN, P. Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA. *Journal of Immunology*, v. 109: 129-135, 1972.

FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L. Reservatórios extra-humanos do complexo *Leishmania* e Dinâmica de Transmissão da Infecção ao Homem. In: COURA, J. R. (Ed.). *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro. p. 739-752, 2005.

FABER, W. R. *et al.* Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 49 (1): 70-74, 2003.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 5. ed. Brasília, 2000.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico - Leishmaniose Tegumentar Americana**. Ano 02, n. 05. Brasília, 2002.

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

GLANTZ, STANTON A. **Primer of Biostatistics**, Version 4.0, McGraw Hill, Fourth Edition. New York - 1997 (Manual com 473 páginas).

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36 (1): 71-80, 2003.

GRIMALDI JR., G.; TESH, B. R. & MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41: 687-725, 1989.

GRIMALDI JR., G. *et al.* Characterization and classification of leishmanial parasites from human, wild animals and sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44: 645-661, 1991.

GRIMALDI JR., G.; TESH, B. R. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Review**, v 6: 230-250, 1993.

GRIMALDI JR., G.; MCMAHON-PRATT, D. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91:37, 1996.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. **Advanced Parasitology**; v. 44: 1-39, 1999

HSU, S. M.; RAINE, L. & FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 29: 577-580, 1981.

JONES, T. C. *et al.* Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 156: 73-83, 1987.

KALIPADA, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Criteria Review of Microbiology**, v. 21: 123 -152, 1995.

KENNER, J. R. *et al.* Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 26: 130-136, 1999.

KILLICK-KENDRICK R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Ann Parasitol Hum Comp**; v. 65 (Suppl) 37- 42. 1990.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). The Leishmaniasis in Biology and Medicine. **Academic Press, London**, v. 1: 1-120, 1987.

LEITE, EDNA *et al.* **Monitorização Biológica de Trabalhadores Expostos a Substâncias Químicas**. Belo Horizonte: Ergo Editora, 1992.

LEVINE, N. D. *et al.* A newly revised classification of the Protozoa. **Journal of Protozoology**, v. 27: 37-58, 1980.

LIVNI, N.; ABRAMOWITZ, A.; LONDNER, M. Immunoperoxidase method of identification of *Leishmania* in routinely prepared histological sections. **Virchows Archives of Pathology and Anatomy**, v. 401: 147-151, 1983.

LUZ, E. *et al.* *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Parana state, southern Brazil. **Annals Tropical Medicine and Parasitology**, v. 94: 623-631, 2000.

McMAHON-PRATT, D.; BENNET, E.; DAVID, J. R. Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of *Leishmania braziliensis*. **Journal of Immunology**, v. 129: 926, 1982.

MAGALHÃES, A. V.; CHIARINI, L. H.; RAICK, A. N. Histopatologia da leishmaniose tegumentar. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 24: 268-276, 1982.

MAGALHÃES, A. V. *et al.* Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28: 253-262, 1986.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 63: 82-104, 1992.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – emerging anthrozoosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública do Rio de Janeiro**, v. 10: 162-164, 1994.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmanioses em áreas urbanas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30: 162-164, 1997.

MCKINNEY, M. M.; PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascite fluid. **Journal Immunology Methods**, v. 96: 271 – 278, 1987.

MELO, M. N. *et al.* Padronização do antígeno de Montenegro. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 19: 161-164, 1977.

MIMORI, T. *et al.* Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy sample by polymorphism-specific polymerase chain reaction. **Gene** v. 210: 179-186, 1998.

MODABBER, F. **Tropical disease research: progress 1991- 92 eleventh programme report of the UNDP/WHO Special Programme for Research (TDR)**. Geneve, p. 77-91, 1993.

OLIVEIRA-NETO, M. P. **Leishmaniose tegumentar no estado do Rio de Janeiro. Estudo de 648 casos observados no Hospital Evandro Chagas**. 116 f. (Doutorado em Medicina) – Departamento de Protozoologia, Fundação Oswaldo Cruz, 1998.

PEREIRA, E. de F. A. **Viabilidade genética e diagnóstico molecular da *Leishmania* spp., pelas técnicas de RAPD e PCR, no estado do Paraná e casos importados**. 65 f. (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2005.

PESSÔA, S. B. & MARTINS, A.V. **Pessoa – Parasitologia Médica**. Ed. Guanabara Koogan. 11ª edição. Rio de Janeiro. 1982.

PESSÔA, S. B. & BARRETO, M. P. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. Ministério da Educação e Saúde. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 527 p., 1948.

PIÑERO, J. *et al.* PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 73: 21-29, 1999.

PIRMEZ, C. *et al.* Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91: 1390-1395, 1993.

PIRMEZ, C. *et al.* Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37: 1819-1823, 1999.

POLAK, J. & VAN NOORDEN, S. **An introduction to immunocytochemistry: current techniques and problems** - Oxford University Press, 1984.

POLAK, J. & VAN NOORDEN, S. **Immunocytochemistry: Modern methods and**

applications. 2. ed. Wright, 1986.

REED, S. G. Diagnosis in Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, New York, v. 14: 471-478, 1996.

RIDLEY, D. S. A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.74: 515-521, 1980.

RIOUX, J. A.; LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PERIERES, J. Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzyme. Suggestion for a new classification. **Annal de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 65: 111-125, 1990.

ROCHA, P. N. *et al.* Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180: 1731-1734, 1999.

RODRIGUES, E. H. G. *et al.* Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40: 3572-3576, 2002.

ROSS, E. Notes on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **Britannic Medicine Journal**, v 2: 1261-1262, 1903.

SABROZA, P. C. **O domicílio como fator de risco na Leishmaniose Tegumentar Americana. Estudo epidemiológico em Jacarepaguá, município do Rio de Janeiro.** 187 f. (Doutorado em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, 1981.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v 55 : 453-83. 2001.

SALINAS, G.; VALDERRAMA, L.; PALMA, G. Detección de amastigotas em leishmaniasis cutânea Y mucocutanea por el metodo de inmunoperoxidasa, usando anticuerpo policlonal: sensibilidad y especificidad comparadas com metodos convencionales de diagnostico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84: 53-60, 1989.

SARAVIA, N. G. *et al.* The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 159: 725-735, 1989.

SCHALLING, H. D. F. H.; OSKAN, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis as parasite identification. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7: 641-51, 2002.

- SCHREIBER, W.; MATHYS, F. K. Leishmaniasis. In: HOFFMAN, F. **Infectious Diseases in the History of Medicine**. La Roche & Co. Limited, Basel, p. 165-167, 1987.
- SCHUBACH, A. *et al.* Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of american Tegumentary Leishmaniasis patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96(7): 987-996, 2001.
- 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.99 (3): 239-251, 2004
- SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent Advances in the Diagnosis of Leishmaniasis. **Journal of Postg Medicine**, v.49 (1): 55-60, 2003.
- SOUZA, W. J. S. *et al.* Montenegro skin test for american cutaneous Leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. **Acta Tropica**, v. 52: 111-119, 1992.
- STERNBERGER, L. **Immunocytochemistry**. 3. ed. John Wiley & Sons. 1986.
- TAFURI, W. L. *et al.* An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunology Methods**, v. 292 (1-2): 17-23, 2004.
- TALHARI, S. *et al.* Leishmaniose no estado do Amazonas. Aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 63: 433-438, 1988.
- TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N. Molecular diagnosis of Leishmaniasis. **Experimental Review of Molecular Diagnosis**, v. 3: 657-67, 2003.
- THIERRY, J. *et al.* Leishmaniose cutanee sud-americaine diagnostic parasitologique et serologique par immunofluorescence indirecte (IFI) et enzyme-linked immuno assay (ELISA): À propos de 94 cas. **Medicine Tropicale**, v. 51 (1): 43-48, 1991.
- THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* Phylogenetic taxonomy of the New World *Leishmania*. **Annals de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 68: 104-406, 1993.
- THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* *Leishmania* species in two regions of Paraná State, Brazil: biochemical characterisation by isoenzyme electrophoresis. In: ROUSSOS, S. *et al.* (Ed.). **New Horizons in Biotechnology**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, p. 4290-439 (chapter 35), 2003.
- WEIGLE, K. A. *et al.* Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colômbia: a comparison of seven methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 36: 489-496, 1987.

WELSH, J.; MCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleotid Acid Research**, v. 18: 7213-7218, 1990.

WHO. **Control of the leishmaniasis. Technical Report Series**. Geneve, 793: 158 p. 1990.

WHO. **Division of control of tropical diseases. Leishmaniasis control latest epidemiological data**. 2004.

WIJEYARATNE, P.; GOODMAN, T.; ESPINAL, C. Leishmaniasis Control Strategies. **Parasitology. Today**, v. 8: 249-250, 1992.

WILLIAMS, J. G. K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleotid Acid Research**, v. 18 (22): 6531-6535, 1990.

ANEXOS

ANEXO 1 – PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS SOLÚVEL E INSOLÚVEL

1. Obter, a partir de cepas de referência, garrafa de Roux rica em *Leishmania*;
2. Filtrar o conteúdo da garrafa, em gaze, para tubo de centrífuga com soro fisiológico a 0,9%;
3. Centrifugar o material a 2500 rpm, a 4°C, por 15 minutos;
4. Desprezar o sobrenadante e adicionar soro fisiológico a 0,3%;
5. Centrifugar o material a 2500 rpm, a 4°C, por 15 minutos;
6. Desprezar o sobrenadante e adicionar solução tampão PBS – pH 7,2;
7. Centrifugar o material a 3500 rpm, a 4°C, por 30 minutos;
8. Desprezar o sobrenadante e adicionar solução tampão PBS – pH 7,2;
9. Congelar a -20°C;
10. Descongelar e centrifugar a 2500 rpm, a 4°C, por 15 minutos;
11. Desprezar o sobrenadante e adicionar água destilada em volume igual à metade do sedimento;
12. Congelar em nitrogênio líquido por 5 minutos;
13. Descongelar imediatamente a 37°C;
14. Repetir os itens 12 e 13 por 5 vezes;
15. Submeter o antígeno ao ultra-som (80 ciclos por minuto), efetuando 5 séries de 30 segundos com intervalos de um minuto em banho de gelo;
16. Centrifugar o antígeno a 15000 rpm, a 4°C, por 30 minutos;
17. Recuperar no sobrenadante o antígeno solúvel e no sedimento o antígeno insolúvel;
18. Filtrar o antígeno solúvel em milipore;
19. Aliquotar e armazenar os antígenos em tubos plásticos a – 70°C.

ANEXO 2 – PROTOCOLO PARA ENZIMAIMUNOENSAIO (ELISA)

ENZIMAIMUNOENSAIO:

1. Sensibilização da placa com antígeno solúvel ("over night" a 4°C, 250 ng/100 µL/cavidade em tampão carbonato 0,05 M));
2. Lavar e secar (2 vezes) com solução de lavagem;
3. Bloquear a placa com solução de caseína a 2% (100 µL/ cavidade, 1 hora a 37°C);
4. Lavar e secar (2 vezes) com solução de lavagem;
5. Adicionar 100 µL/cavidade das amostras e controles diluídos em tampão de incubação (1 hora a 37°C);
6. Lavar e secar (6 vezes) com solução de lavagem;
7. Adicionar conjugado enzimático anti-IgG de coelho peroxidase (Sigma A-6154), diluído 1/1000 (100 µL/cavidade, 1 hora a 37°C);
8. Lavar e secar (6 vezes) com solução de lavagem;
9. Adicionar substrato e cromógeno (100 µL/cavidade, 15 minutos na ausência de luz e temperatura ambiente - 24°C);
10. Acrescentar solução de parada – H₂SO₄ a 5% (50 µL/cavidade);
11. Determinar a absorbância em 492 nm.

SOLUÇÕES:

TAMPÃO CARBONATO 0,05 M: 1,59 g Na₂CO₃
2,93 g NaH CO₃
H₂O destilada qsp 1 L
pH 9,6

SOLUÇÃO DE LAVAGEM: 9,0 g NaCl
0,5 mL Tween 20
H₂O destilada qsp 1 L

SOLUÇÃO TAMPÃO PBS 0,05 M COM 0,15 M NaCl – PH 7,4:

Solução A	Solução B
7,1 g Na_2HPO_4	1,4 g NaH_2PO_4
8,8 g NaCl	1,8 g NaCl
H_2O destilada qsp 1 L	H_2O destilada qsp 1 L

(Ajustar o pH adicionando a solução B na solução A);

SOLUÇÃO DE BLOQUEIO (CASEÍNA 2 %): 2,0 g caseína

100 mL tampão PBS 0,05 M

(Congelar);

TAMPÃO DE INCUBAÇÃO: 25 mL caseína a 2%

200 mL tampão PBS 0,05 M

0,05 % Tween 20

(Congelar);

TAMPÃO CITRATO pH 5,0: 7,10 g Na_2HPO_4

5,19 g Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)

H_2O destilada qsp 1 L

SUBSTRATO: 2 mg de OPD

10 mL de tampão citrato pH 5,0

2 μL de H_2O_2 no momento do uso;

SOLUÇÃO DE PARADA DE REAÇÃO: 1 mL H_2SO_4

19 mL H_2O destilada

ANEXO 3 – PROTOCOLO PARA TRATAMENTO DE SOROS HIPERIMUNES – EXTRAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS (IgG). (Protocolo modificado da *Amersham Biosciences – Antibody Purification Handbook*, 2002, segundo MCKINNEY & PARKINSON, 1987)

1. Obter soros hiperimunes em alíquotas de 20 ml;
2. Centrifugar a 10.000 rpm, por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C;
3. Transferir o sobrenadante para béquer e alcalinizar com 2 mL (proporção 1:10) de tampão Tris-HCl 1M, pH 8,0;
4. Adicionar lentamente 20 a 30 mL de solução saturada de sulfato de amônio, a 4°C (banho de gelo), sob leve agitação, até a solução tornar-se esbranquiçada;
5. Manter em geladeira a 4°C, sob leve agitação, por 18 horas;
6. Centrifugar a solução a 10.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C;
7. Desprezar o sobrenadante e lavar o precipitado (2 vezes), com igual volume de solução saturada de sulfato de amônio. Centrifugar a solução a 10.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C;
8. Dissolver o precipitado em 20 mL de tampão PBS 0,05 M, pH 7,4;
9. Dializar a solução em tampão PBS 0,05 M, pH 7,4, utilizando membrana de celulose previamente fervida, para remoção do sulfato de amônio. Realizar a diálise em geladeira, a 4°C, sob leve agitação durante 48 horas em frascos erlenmeyer de 1 litro. Substituir o tampão a cada hora durante as três primeiras horas e posteriormente a cada 12 horas;
10. Após a diálise, fracionar a solução contendo as imunoglobulinas (IgG) em alíquotas e congelar (-20°C ou -80°C);

ANEXO 4 – PROTOCOLO PARA PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS

PREPARO DA COLUNA

1. Preparar coluna com resina de G – sepharose (Sephadex® G-50), reidratando 0,5 g de resina com 7 mL de H₂O destilada.
2. Montar a resina na coluna e lavar com 30 mL de H₂O destilada. Equilibrar a resina com 50 mL de tampão Tris 50 mM pH 7,0;

PROCEDIMENTO CROMATOGRÁFICO

1. Adicionar à uma alíquota de 4 mL de solução contendo imunoglobulinas igual volume de tampão Tris 100 mM pH 7,0. Filtrar a solução em milipore (0,4 a 0,8 µm) em banho de gelo (4°C);
2. Incubar a solução em coluna de G – sepharose (pré equilibrada), *over night*, em geladeira a 4°C;
3. Lavar a resina com 100 mL de tampão Tris 50 mM pH 7,0;
4. Eluir as frações IgG purificadas com solução de glicina 0,1 M pH 2,5 (preparar antes do uso);
5. Nos tubos utilizados para a coleta de frações, adicionar previamente 100 µL de solução Tris 1 M pH 9,0 (neutralização de pH);
6. Leitura da absorbância em A₂₈₀ para determinação da concentração de proteínas (IgG);
7. Dializar as frações contendo IgG, utilizando membrana de celulose previamente fervida, em 1 litro de tampão PBS 0,05 M pH 7,4 com três substituições do tampão (2 horas, 12 horas e 2 horas).

ANEXO 5 - CONDIÇÕES DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR),
UTILIZANDO OS INICIADORES b1 E b2

CARACTERÍSTICA	b1/b2
Produto PCR	103 pb
Reação Mix	
Tampão PCR 10x	10 mM Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM KCl
dNTP (cada)	0,2 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Iniciador	50 pmol
Taq polimerase	0,6 U
Ciclos	
Desnaturação inicial	95°C por 5 minutos
Desnaturação	95°C por 30 segundos
Anelamento	70°C por 90 segundos
Extensão	72°C por 90 segundos
Nº de ciclos	35
Extensão final	72°C por 10 minutos

FONTE : PEREIRA (2005)

ANEXO 6 – PROTOCOLO PARA PREPARAÇÕES IMUNOCITOQUÍMICAS / IMUNOHISTOQUÍMICAS

1. Desparafinar e hidratar a seção de tecido (IHQ) através de xileno e série de álcoois graduados. As amostras para ICQ devem ser hidratadas por 5 minutos com tampão PBS 0,05 M pH 7,4, em temperatura ambiente (24°C);
2. Enxaguar por 5 minutos em água destilada;
3. Secar cuidadosamente as lâminas ao redor do tecido. Para extinção da atividade da peroxidase endôgena, adicionar 100 µL (suficiente para cobrir o tecido) de peróxido de hidrogênio 3% v/v em metanol e incubar por 5 minutos em temperatura ambiente (24°C);
4. Lavar 3 vezes com tampão PBS 0,05 M pH 7,4;
5. Retirar o excesso de tampão, secar cuidadosamente as lâminas em torno do corte, adicionar 100 µL de soro normal anti-*horseradish* peroxidase-HRP e incubar por 5 minutos em temperatura ambiente (24°C);
6. Não enxaguar. Retirar o excesso de soro. Secar cuidadosamente as lâminas. Para cada amostra e controles adicionar 100 µL (suficiente para cobrir o tecido) do anticorpo primário. Incubar por 20 minutos em temperatura ambiente (24°C);
7. Lavar 3 vezes com tampão PBS 0,05 M pH 7,4;
8. Retirar o excesso de tampão, secar cuidadosamente as lâminas em torno do corte, adicionar 100 µL (suficiente para cobrir o tecido) do anticorpo de ligação biotilado – antioelho. Incubar por 20 minutos em temperatura ambiente (24°C);
9. Lavar 3 vezes com tampão PBS 0,05 M pH 7,4;
10. Retirar o excesso de tampão, secar cuidadosamente as lâminas em torno do corte, adicionar 100 µL (suficiente para cobrir o tecido) do reagente de marcação (complexo peroxidase-estreptavidina). Incubar por 20 minutos em temperatura ambiente (24°C). Durante a incubação preparar a solução de substrato – DAB);
11. Lavar 3 vezes com tampão PBS 0,05 M pH 7,4;
12. Retirar o excesso de tampão, secar cuidadosamente as lâminas em torno do corte, adicionar 100 µL (suficiente para cobrir o tecido) do substrato – DAB. Incubar por 5 minutos em temperatura ambiente (24°C);

13. Lavar bem com água destilada, mergulhar as lâminas em água destilada e incubar por 1 minuto;
14. Contracorar com hematoxilina e montar lâminas permanentes com bálsamo do Canadá ou similar.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)