



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA

Mestrado do programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Pesquisa Clínica Em Doenças  
Infecciosas

**CAIO THOMAZ DE LIMA E SILVA**

**Quantificação da carga parasitária em amostras coletadas de borda interna e  
externa de lesões cutâneas ulceradas de pacientes com leishmaniose tegumentar  
americana**

**Aluno: Caio Thomaz de Lima e Silva**

**Orientador: Mauro Celio de Almeida Marzochi**

**Co-orientador: Cintia Xavier de Mello**

Rio de Janeiro  
2020

**CAIO THOMAZ DE LIMA E SILVA**

**Quantificação da carga parasitária em amostras coletadas de borda interna e externa de lesões cutâneas ulceradas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana**

Dissertação apresentada ao Curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia para obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Orientador: Mauro Celio de Almeida Marzochi, D. Sc.  
Co-orientadora: Cintia Xavier de Mello, D. Sc.

Rio de Janeiro  
2020

Thomaz de Lima e Silva, Caio .

Quantificação da carga parasitária em amostras coletadas de borda interna e externa de lesões cutâneas ulceradas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana / Caio Thomaz de Lima e Silva. - Rio de Janeiro, 2020.

92 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2020.

Orientador: Mauro Celio de Almeida Marzochi.

Co-orientadora: Cintia Xavier de Mello.

Bibliografia: f. 59-64

1. leishmaniose cutânea. 2. carga parasitária. 3. diagnóstico. I. Título.

**CAIO THOMAZ DE LIMA E SILVA**

**Quantificação da carga parasitária em amostras coletadas de borda interna e externa de lesões cutâneas ulceradas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana**

Dissertação apresentada ao Curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia para obtenção do grau de Mestre ciências.

Orientador: Mauro Celio de Almeida Marzochi, D. Sc.

Co-orientadora: Cintia Xavier de Mello, D. Sc.

Banca Examinadora

---

**Prof. Dr. Armando de Oliveira Schubach** (Presidente)

Doutor em: Biologia Parasitária  
Instituto Nacional de Infectologia/Fiocruz

---

**Prof. Dr. Otavio de Melo Espíndola**

Doutor em: Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.  
Instituto Nacional de Infectologia/Fiocruz

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Marcia Pereira de Oliveira Duarte**

Doutor em: Biologia Parasitária  
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra Maria Inês Fernandes Pimentel** (Suplente)

Doutora em: Medicina (Dermatologia)  
Instituto Nacional de Infectologia/Fiocruz

Rio de Janeiro  
2020

Dedico este trabalho a minha  
família por todo apoio e  
cuidado.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** por sempre me dar saúde, sabedoria e infinitas bênçãos que me permitiram chegar até aqui.

A **minha família**, que sempre buscou me estimular e apoiar nessa longa jornada e por sempre acreditar em mim.

A minha tia **Marianne Ramos**, por todo apoio, incentivo, cuidado, força e carinho.

Aos meus médicos de São Paulo, **Dr. Elias** e **Dr. David**, não apenas por cuidarem da minha saúde, mas também por todos os conselhos e incentivos que foram fundamentais para realização desta conquista.

Ao **Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas**, em especial a equipe da referência, por todo apoio, suporte e momentos de descontração.

Ao **Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses**, pelo seu ótimo ambiente de trabalho e pessoas maravilhosas que foram essenciais na minha formação, me apoiando ao longo da minha trajetória acadêmica.

Ao meu orientador **Dr. Mauro Marzochi**, por aceitar orientar este trabalho e por todo seu indispensável suporte.

A co-orientadora **Dr<sup>a</sup>. Cintia Mello**, por toda sua ajuda neste trabalho, sempre e disposta a me ensinar, tirando dúvidas e me auxiliando em todas as etapas deste projeto e por acreditar em mim me ajudando a crescer enquanto profissional. Por ter sido amiga, pela credibilidade, pela atenção, pelo estímulo, apoio e carinho.

Ao **Dr. Armando Schubach** e **Dr<sup>a</sup> Maria Inês**, pela valiosa contribuição com a realização deste trabalho durante o acompanhamento nos seminários científicos.

Ao **Dr. Otávio de Melo Espíndola**, pelo seu indispensável auxílio na etapa de biologia molecular do projeto.

Ao **Dr Leonardo Quintella**, por toda colaboração e auxílio na realização do estudo histopatológico deste projeto.

A **Dr<sup>a</sup> Raquel Vasconcellos**, pelo desenvolvimento da parte estatística do projeto.

As alunas de Iniciação Científica, **Adriane Côrrea** e **Luana Barretos** por todo seu auxílio e dedicação a este projeto.

Aos meus amigos do mestrado, pelo companheirismo em todos os momentos, em especial **Anna Procópio, Ingrid Ludmilla e Iara Bastos** que foram ótimas amigas e sempre me ajudaram de diversas formas durante o andamento do curso.

A **Drª Fátima Madeira**, por todos os conselhos ao longo desta trajetória.

Ao projeto **Inova Fiocruz**, pelo apoio financeiro adicional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001.

Todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram até este momento, vocês têm a minha mais sincera gratidão.

“Quando estiver na escuridão,  
lembre-se do que aprendeu na  
luz” (Richard Wurmbrand).



## RESUMO

As leishmanioses constituem um grupo de doenças infecciosas de transmissão vetorial, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que acometem o ser humano e animais. No Brasil, a leishmaniose cutânea (LC) é uma doença com registro de casos e de vetores em todo território nacional. A úlcera típica da leishmaniose cutânea é arredondada, indolor, base infiltrada e endurecida, bordas bem delimitadas e elevadas, variando de uma a poucas lesões na maioria dos casos. A pesquisa direta de formas amastigotas, com o auxílio da microscopia ótica, é o método mais simples e tradicional utilizado no diagnóstico da doença. Consiste em pesquisar o parasito em material obtido de escarificação da borda das lesões, sem a necessidade de anestesia local. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem alcançando cada vez mais aplicabilidade no campo do diagnóstico das leishmanioses, principalmente por sua alta sensibilidade, superando os métodos diretos. O exame histopatológico, apesar da baixa sensibilidade para o diagnóstico da LC, é útil no diagnóstico diferencial, além de permitir estudar os tipos e a distribuição de células na lesão. Segundo as recomendações da Organização Mundial de Saúde, o local de eleição para coleta de material para diagnóstico da LC é a borda da lesão, pois supõe-se que essa localização contenha a maior quantidade de parasitos. Entretanto, alguns autores têm observado uma maior carga parasitária na borda interna da lesão quando comparado com a borda externa. No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda a borda interna. Este estudo tem como objetivo avaliar comparativamente a carga parasitária e o perfil histopatológico na borda interna e externa de lesões cutâneas ulceradas de LC. Para avaliar a diferença quantitativa nas duas localizações, foi utilizada a PCR quantitativa (qPCR). O DNA foi extraído de material de lâminas coletadas previamente, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A quantificação das amostras foi realizada pela qPCR utilizando o sistema SYBR Green com *primers* direcionados ao minicírculo do kDNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e gen  $\beta$ -actina. Foram recuperados blocos de parafina de 19 pacientes, dos quais foram preparadas lâminas coradas pela hematoxilina-eosina para avaliação semi quantitativa dos tipos celulares presentes em cada um dos locais da lesão. Foram analisadas lâminas confeccionadas com material proveniente de escarificação das bordas interna e externa, *imprint* e histopatologia, totalizando 156 lâminas provenientes, respectivamente, de 39 pacientes diagnosticados com LC. Tanto pela qPCR, quanto pelo exame direto foi possível observar maior carga parasitária na borda interna da lesão em relação à borda externa e *imprint*. Pela análise histopatológica também foi encontrado um maior índice parasitário na borda interna da lesão. Apesar da menor quantidade de parasitos por lâmina, o *imprint* permitiu o diagnóstico em 27 pacientes, comparado com 23 diagnósticos na borda interna. Talvez, a menor quantidade de artefatos nas lâminas de *imprint* facilite a visualização das formas amastigotas. Entretanto, o uso da escarificação na rotina de diagnóstico apresenta vantagens, por ser uma técnica simples, pouco invasiva, que não requer anestesia e que pode ser realizada repetidas vezes, por profissional não médico, em áreas endêmicas. Portanto, os resultados sugerem que a escarificação da borda interna da lesão seja o método indicado para coleta de amostras com fins de diagnóstico molecular e exame direto.

**Palavras chave:** *Leishmania*, leishmaniose cutânea, carga parasitária, diagnóstico

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of vector borne infectious diseases, caused by protozoa of the genus *Leishmania* that affects humans and animals. In Brazil, cutaneous leishmaniasis (CL) is a disease with registered cases and vectors throughout the national territory. A typical ulcer of cutaneous leishmaniasis is rounded, painless, the base is infiltrated and hardened, with well-defined and high edges, varying from one to a few lesions in most cases. The direct search for amastigotes, by optical microscopy, is the simplest and most traditional method used in the diagnosis of the disease. The parasite is searched in clinical specimens obtained by scrapings in the borders of the lesions, without the need for local anesthesia. The polymerase chain reaction (PCR) have been increasingly applied in the field of leishmaniasis diagnosis, mainly due to its high sensitivity, surpassing the traditional methods. Histopathological examination, despite the low sensitivity for the diagnosis of CL, is useful in the differential diagnosis, in addition to allowing the study of cell types and the distribution in the lesion. According to the recommendations of the World Health Organization, the selection site for the collection of material for the diagnosis of CL is the edge of the lesion, since it is supposed to contain a greater number of parasites. However, some authors have observed a greater parasitic load on the inner edge of the lesion when compared to the outer edge. This study aims to comparatively evaluate the parasitic load and the histopathological profile on the inner and the outer edge of skin ulcerated lesions of CL. To assess the parasitic load difference in these two locations, quantitative PCR (qPCR) was used. DNA was extracted from material from previously collected slides, fixed with methanol and stained with Giemsa. We used SYBR Green system with primers directed to the kDNA minicircle of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and the  $\beta$ -actin gen. Slides made with material from the inner and the outer edge scraping, imprint and histopathology were analyzed, totaling 156 slides from, respectively, 39 patients diagnosed with CL. Both through qPCR and direct examination it was possible to observe a greater parasitic load on the inner edge of the lesion in relation to the outer edge and imprint. Histopathological analysis also found a higher parasitic index on the inner edge of the lesion. Despite the lower number of parasites per slide, the imprint allowed the diagnosis in 27 patients, compared with 23 diagnoses at the inner edge. Perhaps, the smallest amount of artifacts on the imprint slides facilitate the visualization of some amastigotes. However, the use of scraping technique in the diagnostic routine has some advantages, as it is a simple, low-invasive technique that does not require anesthesia and can be performed repeatedly by a non-medical professional in endemic areas. Therefore, the results suggest that the scraping technique of the inner edge of the lesion is the recommended method for collecting samples for the purposes of molecular diagnosis and direct examination.

**Keywords:** *Leishmania*, American cutaneous leishmaniasis, parasitic load, diagnosis

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Lesão cutânea ulcerada característica de leishmaniose cutânea (Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar, 2017).....	03
<b>Figura 2:</b> (A) Representação esquemática dos locais da lesão onde foram realizadas as coletas e (B) lâmina com áreas demarcadas utilizada para preparação da escarificação e <i>imprint</i> (de MELLO et al., 2011).....	14
<b>Figura 3:</b> Coleta de espécimes clínicos de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. <b>A:</b> Escarificação de borda interna e externa da lesão com auxílio de bisturi. <b>B:</b> <i>Imprint</i> com punch de 5mm (Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em leishmanioses).....	15
<b>Figura 4:</b> Cálculo da carga parasitária. Resultados expressos em equivalente de parasito por $\mu\text{g}$ de tecido.....	19
<b>Figura 5:</b> Fluxograma de inclusão/exclusão de pacientes avaliados no estudo.....	24
<b>Figura 6:</b> Validação da curva padrão de <i>Leishmania braziliensis</i> construída a partir de diluições seriadas de $1,0 \times 10^4$ até $1,0 \times 10^{-2}$ .....	26
<b>Figura 7:</b> Curva de “Melting” para kDNA (A) e $\beta$ -actina (B).....	26
<b>Figura 8:</b> Quantificação absoluta da carga parasitária de escarificação da borda interna, borda externa, e <i>imprint</i> de lesões cutâneas ulceradas de 39 pacientes confirmados com leishmaniose tegumentar americana, Rio de Janeiro, Brasil, 2009-2010.....	28
<b>Figura 9:</b> Número de caselas positivas pelo exame direto em <i>imprint</i> , borda interna e borda externa ( $\times 1000$ ) de lesões cutâneas ulceradas de leishmaniose tegumentar americana de 39 pacientes, Rio de Janeiro, Brasil, 2009-2010.....	30
<b>Quadro 1:</b> Variáveis histopatológicas analisadas em cortes histológicos provenientes de lesão cutânea ulcerada de 39 pacientes com diagnóstico de LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).	
<b>Figura 10.</b> Úlcera bem caracterizada – perda do revestimento epitelial, fundo da úlcera com material fibrinoso e necrótico, e logo abaixo, tecido de granulação (proliferação de vasos). HE x 40.....	33
<b>Figura 11.</b> Hiperplasia pseudoepiteliomatosa. HE x 100.....	33
<b>Figura 12:</b> Necrose caseosa em granuloma mal formado HE x 100.....	34
<b>Figura 13:</b> Necrose liquefativa. HE x 400.....	34
<b>Figura 14:</b> Necrose fibrinoide (linha azul). HE x 40.....	35
<b>Figura 15:</b> Granuloma mal formado (elipse roxa à esquerda) e bem formado (círculo vermelho à direita). HE x 400.....	35
<b>Figura 16:</b> <b>A:</b> Plasmócitos +++, em meio a hiperplasia pseudoepiteliomatosa. HE x 400.....	36

<b>Figura 17:</b> Linfócitos +++.	HE x 400.....	36
<b>Figura 18:</b> Neutrófilos + (isolados).	HE x 400.....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sequência de <i>primers</i> utilizados para kDNA e $\beta$ -actina.....	17
<b>Tabela 2:</b> Distribuição das características clínico-epidemiológicas de 39 pacientes com diagnóstico de LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).....	25
<b>Tabela 3:</b> Carga parasitária de escarificação da borda interna, borda externa, e <i>imprint</i> de lesões cutâneas ulceradas de 39 pacientes confirmados com LC, atendidos Rio de Janeiro, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).....	27
<b>Tabela 4:</b> Variáveis histopatológicas analisadas em cortes histológicos provenientes de lesão cutânea ulcerada de 39 pacientes com diagnóstico de LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).....	31

## LISTA DE SIGLAS

**AM** - Antimoniato de meglumina  
**BE** - Borda externa  
**BI** - Borda interna  
**CLIOC** - Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz  
**CQ** - Ciclo de quantificação  
**CSB** - Blocos altamente conservados (“conserved sequence blocks”)  
**DNA** - Ácido desoxirribonucleico  
**ELISA** - Ensaio imuno Enzimático  
**HEPE** - Hiperplasia escamosa pseudoepiteliomatosa  
**IDRM** - Intradermoreação de montenegro  
**INI** - Instituto Nacional Infectologia Evandro Chagas  
**ITS** - Internal transcribed spacer  
**kDNA** – DNA do cinetoplasto  
**LC** - Leishmaniose cutânea  
**LM** - Leishmaniose mucosa  
**LT** - Leishmaniose tegumentar  
**LTA** - Leishmaniose tegumentar americana  
**LV** - Leishmaniose visceral  
**NNN** - Neal, Novy e Nicolle (NNN)  
**NTC** - Controle negativo  
**PBS** - Solução salina tamponada de fosfato  
**PCR** - Reação em cadeia da polimerase  
**qPCR** - PCR quantitativa  
**R<sup>2</sup>** - Coeficiente de linearidade  
**SFM** - Sistema fagocítico mononuclear  
**SSR** - Subunidade menor de RNA ribossomal

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1. ASPECTOS GERAIS .....	13
1.2. DIAGNÓSTICO .....	16
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>22</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>233</b>
3.1. GERAL .....	233
3.2. ESPECÍFICOS .....	233
<b>4. MÉTODOS</b> .....	<b>244</b>
4.1. DESENHO DO ESTUDO .....	244
4.2. LEITURA DAS LÂMINAS DE ESCARIFICAÇÃO E <i>IMPRINT</i> .....	244
4.3. CASUÍSTICA.....	244
4.4. TAMANHO AMOSTRAL .....	255
4.5. CRITÉRIO DE ELEGIBILIDADE E SELEÇÃO DA AMOSTRA .....	255
4.6. VARIÁVEIS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS .....	255
4.7. MATERIAIS, PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS .....	255
4.7.1. Coleta de material.....	255
4.7.2. Preparação das curvas padrão .....	277
4.7.3. Padronização da curva padrão.....	288
4.7.4. qPCR .....	288
4.7.5. Análise Histopatológica .....	311
4.8. Plano de análise.....	333
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>344</b>
5.1. PACIENTES.....	344
5.2. VARIÁVEIS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS .....	355
5.3. PADRONIZAÇÃO DAS CURVAS PADRÃO .....	37
5.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA TOTAL EXTRAÍDO DE LÂMINAS ESCARIFICAÇÃO DE BORDA INTERNA E EXTERNA E DE <i>IMPRINT</i> DE LESÕES CUTÂNEAS ULCERADAS DE LC .....	388
5.5. QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DA CARGA PARASITARIA .....	39
5.6. ASSOCIAÇÃO ENTRE CARGA PARASITÁRIA DE ESCARIFICAÇÃO EM BORDA INTERNA, BORDA EXTERNA E <i>IMPRINT</i> E DESFECHO CLÍNICO .....	40
5.7. AVALIAÇÃO SEMI QUANTITATIVA DO EXAME DIRETO .....	41
5.8. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	42
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>58</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>59</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>653</b>
Anexo I - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	63
Anexo II - Parecer consubstanciado do CEP.....	69
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>76</b>
Apêndice A - Resultados de carga parasitária pela qPCR, número de caselas positivas no exame direto, tempo de evolução de lesão e desfecho clínico em amostras de escarificação de borda interna, escarificação de borda externa e <i>imprint</i> de 39 pacientes diagnosticados com LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).....	76
Apêndice B - Avaliação histopatológica semi-quantitativa das formas amastigotas encontradas em borda interna e externa de cortes histológicos de lesão cutânea ulcerada de 19 pacientes diagnosticados com LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).....	77
Apêndice C - Avaliação histopatológica das alterações gerais encontradas em borda interna e externa de cortes histológicos de lesão cutânea ulcerada de 19 pacientes diagnosticados com LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).....	78



Apêndice D - Avaliação histopatológica de granulomas em borda interna e externa de cortes histológicos de lesão cutânea ulcerada de 19 pacientes diagnosticados com LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).....	79
Apêndice E - Avaliação histopatológica dos tipos de necrose em borda interna e externa de cortes histológicos de lesão cutânea ulcerada de 19 pacientes diagnosticados com LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).....	80
Apêndice F - Avaliação histopatológica semi quantitativa de plasmócitos, linfócitos e neutrófilos em borda interna e externa de cortes histológicos de lesão cutânea ulcerada de 19 pacientes diagnosticados com LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).....	81
Apêndice G - Avaliação das alterações histopatológicas específicas em borda interna e externa de cortes histológicos de lesão cutânea ulcerada de 19 pacientes diagnosticados com LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).....	82

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. ASPECTOS GERAIS

As leishmanioses constituem um grupo de doenças infecciosas que representam um problema de saúde pública no mundo, ocupando lugar entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). As leishmanioses podem ser classificadas como duas doenças distintas: leishmaniose tegumentar (LT), formas cutânea e mucosa, e leishmaniose visceral (LV). Ambas são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos por insetos vetores do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae), conhecidos como flebotomíneos. O ciclo biológico compreende formas promastigotas e paramastigotas, flageladas que se desenvolvem no trato alimentar dos flebotomíneos, e formas amastigotas, sem flagelo livre, que parasitam células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado (BRASIL, 2017).

A LT é difundida nas áreas tropicais e subtropicais e é encontrada em 98 países da Europa, África, Ásia e América. Entretanto, mais de 90% dos novos casos ocorrem em apenas 13 países (Afeganistão, Argélia, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Índia, Irã, Peru, Sudão do Sul, Sudão e Síria). Estima-se que aproximadamente 0,9 a 1,7 milhões de pessoas são infectadas a cada ano, porém apenas uma pequena fração desenvolve a doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

A doença pode ser sub classificada em LT do Velho Mundo e Novo Mundo. A LT do Velho Mundo é endêmica na Ásia, África e sul da Europa e de forma geral apresenta cura espontânea podendo não necessitar de tratamento, enquanto a LT do Novo Mundo é predominante nas regiões da América Central e América do Sul, pode causar até mesmo lesão mucosa, e geralmente requer tratamento parenteral mais enérgico (KEVRIC;CAPPEL;KEELING,2015).

No Brasil, a leishmaniose cutânea (LC) é registrada em todos os estados da federação, associada a sete espécies de *Leishmania*, sendo *Leishmania (V.) braziliensis* a espécie mais prevalente (BRASIL, 2017).

A patogenia da leishmaniose tegumentar americana (LTA) depende de diversos fatores complexos na relação parasito-hospedeiro, dependendo da virulência do parasito e da resposta imune específica do hospedeiro. Após o flebotomíneo inocular formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro vertebrado, estes parasitos se aderem por mecanismos pouco esclarecidos a macrófagos e células de Langerhans, diferenciando-se em formas amastigotas, que possuem mecanismos de defesa específicos que permitem sua multiplicação por divisão binária dentro do ambiente tóxico dos macrófagos, até causar o seu rompimento e posterior fagocitose por outros macrófagos, propagando a infecção e também liberando partículas de antígenos que vão ativar o sistema imune específico (BRASIL, 2017).

O período de incubação da doença no hospedeiro vertebrado costuma levar de uma a quatro semanas, porém pode levar anos em alguns casos. A duração do ciclo de vida no vetor varia de 4 a 18 dias, dependendo da espécie de *Leishmania*; pode ser estendido a baixas temperaturas ou encurtado em altas temperaturas (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

As manifestações clínicas na LTA apresentam amplo espectro, que pode ser um reflexo da complexa interação entre a resposta imunológica do paciente e as características genéticas das espécies envolvidas na infecção (BRASIL, 2017). A úlcera típica da leishmaniose cutânea é única, arredondada, indolor, medindo até alguns centímetros, base infiltrada e endurecida, bordas bem delimitadas, elevadas e eritematosas, fundo granuloso e avermelhado (Figura 1).

**Figura 1:** Lesão cutânea ulcerada característica de leishmaniose cutânea.



**Fonte:** Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar, 2017

A lesão típica de LTA pode ser confundida com outras doenças infecciosas, principalmente esporotricose. As lesões cutâneas da LTA ainda podem se apresentar em formas atípicas como lesões com diferentes aspectos: verrucosas, eczematóides, pápulas, placas, entre outras. Esta diversidade de manifestações clínicas também deve ser considerada no diagnóstico diferencial com paracoccidioidomicose, sífilis, hanseníase, tuberculose cutânea, cromoblastomicose, entre outras (de MELLO, 2015).

A leishmaniose mucosa (LM), também conhecida como “espundia”, é uma forma clínica que acomete as vias aéreas superiores (geralmente região nasal podendo afetar até a laringe) e a cavidade oral. O tratamento para LM é mais demorado e apresenta maior frequência de recidivas. O diagnóstico parasitológico direto é difícil devido à baixa carga parasitária nestas lesões, sendo geralmente necessários outros métodos mais sensíveis como cultura ou PCR (JARA et al., 2013; BRASIL, 2017).

No Brasil, dentre os fármacos de primeira escolha preconizados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2017) para o tratamento da LTA está o antimoniato de meglumina (AM), um pró fármaco que tem como mecanismo de ação a inibição do processo de glicogenólise e de oxidação de ácidos graxos dos parasitos (HALDAR; SEN; ROY, 2011). Segundo o Manual de Vigilância em Leishmaniose Tegumentar, a dose recomendada deste fármaco é de 10 mg a 20 mg  $Sb^{+5}/kg/dia$ , apresentando efeitos adversos que dificultam a adesão e tratamento (BRASIL, 2017).

Alguns estudos foram realizados visando contornar estes efeitos adversos, utilizando esquema de baixa dose, 5mg Sb<sup>5+</sup>/kg/dia e via intralesional, apresentando bons resultados e maior segurança em pacientes idosos ou com comorbidades (OLIVEIRA-NETO et al., 1996; OLIVEIRA-NETO et al., 1997, CATALDO et al 2018, DUQUE et al 2019). Estudos têm demonstrado que não há diferença significativa entre o tempo médio de cura entre dose baixa e dose padrão de AM (SCHUBACH et al. 2005; SAHEKI et al. 2017), Vale ressaltar que no ano de 2017 o tratamento intralesional, assim como o tratamento sistêmico com baixa dose foram reconhecidos como alternativas no tratamento de LC pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2017).

## 1.2. DIAGNÓSTICO

Na LC os padrões clínicos e epidemiológicos são diversos, por essa razão, o diagnóstico nem sempre é uma tarefa fácil devendo sempre que possível estar apoiado nos exames laboratoriais, aspectos clínicos e evidências epidemiológicas. Uma importante ferramenta para o diagnóstico laboratorial, o antígeno para realização da intradermoreação de Montenegro (IDRM) teve sua produção industrial descontinuada (BRASIL, 2015) e neste contexto as técnicas de exame parasitológico diretos se tornaram ainda mais utilizadas no diagnóstico da LC por serem rápidas, de baixo custo, simples realização e por fornecer um diagnóstico de certeza (BRASIL, 2017), pois se baseiam na visualização de formas amastigotas de *Leishmania*, que apresentam tamanho entre 2-4 µm, membrana celular bem definida, núcleo circular e cinetoplasto em forma de bastão, levemente mais escuro que o núcleo (ROSS, 1903).

Os métodos mais tradicionais de confecção de lâminas para o exame direto são por impressão do fragmento tecidual (*imprint*) e por distensão de material obtido por escarificação da borda da lesão. Para preparação do *imprint* é realizada uma biópsia da lesão, e o fragmento de tecido coletado é levemente pressionado sobre lâmina de vidro. Este método tem como desvantagem incluir etapas de anestesia, excisão cirúrgica do fragmento tecidual e sutura, procedimentos privativos do profissional médico. O exame direto de material obtido por escarificação da borda da lesão com distensão em lâmina

de vidro, sem a necessidade de anestesia local, constitui um dos métodos mais simples e mais antigos a ser utilizado no diagnóstico da leishmaniose (SILVA, 1915). Este método permanece ainda como o mais acessível para o diagnóstico definitivo da leishmaniose (RAMIREZ et al., 2000; BRASIL, 2017). Como desvantagens da escarificação, podemos citar a baixa qualidade do material coletado (debris celulares). Outras técnicas de coleta de material também são descritas na literatura, como aspiração por agulha fina, *swab*, teste de Tzanck ou sonda dentária (de MELLO, 2015). Todos os métodos mencionados empregam preparações em lâminas de vidro, fixadas e coradas com misturas derivadas de Romanowsky (DE MELLO et al., 2011; ADAMS et al., 2014).

A sensibilidade do exame direto depende de diversos fatores, que incluem a carga parasitária, região de coleta da amostra, qualidade do material coletado e a experiência do profissional responsável (de MELLO et al., 2011). Apesar de proporcionar um diagnóstico de certeza, a leitura das lâminas é demorada e exaustiva, principalmente em áreas endêmicas para *Leishmania braziliensis*, cuja infecção cursa com baixa carga parasitária na lesão (de MELLO, 2015).

Dentre os métodos parasitológicos, a cultura é um método indireto de detecção de parasitos. Geralmente utiliza-se o meio de cultura Neal, Novy e Nicolle (NNN) + Schneider<sup>®</sup> no qual a amostra clínica é incubada em estufa a temperatura de 24-26°C. Quando os exames são positivos, geralmente a partir do quinto dia, é possível visualizar formas promastigotas a fresco, por microscopia ótica (BRASIL, 2017; MADEIRA et al., 2006). Adicionalmente, os parasitos isolados podem ser criopreservados para posterior identificação da espécie e outros estudos (HANDLER et al., 2015).

Na LC devido aos baixos títulos de anticorpos circulantes os testes sorológicos pouco auxiliam no diagnóstico. Geralmente, são utilizados o teste de imunofluorescência indireta e o ensaio imuno enzimático (ELISA). São relatadas reações cruzadas, principalmente com doença de chagas, esporotricose e

paracoccidiomicose (BARROS et al, 2005; MALCHIODI et al, 2008; SZARGIKI et al, 2009).

O exame histopatológico constitui outro método diagnóstico que, apesar de apresentar baixa sensibilidade para visualização de formas amastigotas, é importante no diagnóstico diferencial e por permitir estudar o infiltrado inflamatório produzido durante a infecção por parasitos do gênero *Leishmania*. As alterações histopatológicas na LC podem ser visualizadas em cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina e são caracterizadas por uma reação inflamatória crônica, geralmente granulomatosa, com a presença de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, podendo haver áreas necróticas focais. Formas amastigotas podem ser encontradas livres e no citoplasma de macrófagos como organismos arredondados, com um núcleo circular, um cinetoplasto em forma de bastão e cercados por um halo claro em volta da membrana celular (BOER 2006; QUINTELLA et al, 2011).

Algumas classificações histopatológicas da LC foram propostas como a de BRYCESON (1969) que propõe uma classificação baseada em estudos de casos da forma difusa da doença encontrados na Etiópia. Devido à raridade desses casos no Brasil e pelo fato de não discutir fenômenos necróticos, comuns nesse País, essa classificação foi pouco aplicada aqui. Ridley & Ridley (1980) fundamentaram sua classificação em fenômenos necróticos utilizando amostras do Brasil, América Central e Velho Mundo e classificaram os casos em três grupos básicos: resposta macrofágica intacta, necrose difusa e necrose central. Por ter se baseado em um grupo heterogêneo essa classificação também não refletiu os casos encontrados no Brasil.

Finalmente, Magalhães et al. (1986) em um clássico estudo, analisaram biópsias de 378 pacientes infectados com *L. braziliensis*, cujas alterações dérmicas ou do córion da mucosa, permitiram a classificação dos achados histológicos em cinco grupos: tipo I, apresentando reação exsudativa celular devido a infiltração de linfócitos, histiócitos e plasmócitos sem granuloma; tipo II, que exhibe reação necrótica exsudativa caracterizada por infiltração celular e necrose sem granulomas; tipo III, que apresenta

granuloma necrótico e exsudativo, que corresponde ao padrão de reação inflamatória necrótica e crônica; tipo IV, na qual é possível visualizar reação granulomatosa exsudativa, com granulomas desorganizados e sem necrose; e tipo V, exibindo uma reação tuberculóide exsudativa com granuloma tuberculóide habitualmente organizado. Através desse estudo, foi possível afirmar que 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 tipo encontrado e documentado com maior frequência em pacientes com lesão ulcerada de LC tem sido o tipo IV. É importante ressaltar que pode haver mais de um padrão histológico no mesmo fragmento tecidual conforme descrito por Quintella (comunicação pessoal, 20 de novembro de 2019).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) vem alcançando cada vez mais aplicabilidade no campo do diagnóstico das leishmanioses. Uma das principais vantagens do uso da PCR é a possibilidade de detecção de DNA do parasito mesmo quando há baixa carga parasitária, superando nesse sentido os métodos tradicionais (PIRMEZ et al, 1999; FAGUNDES et al, 2010; CRUZ et al., 2013; BRASIL, 2017). A técnica procura reproduzir o que ocorre na natureza e consiste na amplificação “in vitro”, de forma exponencial, pela enzima taq DNA polimerase, do material genômico do parasito e posterior visualização dos produtos amplificados em gel de agarose corado por intercalantes fluorescentes de DNA. Métodos baseados na PCR são também utilizados para caracterização de parasitos e estimativa de carga parasitária, alcançando aplicabilidade em estudos epidemiológicos, monitoramento de tratamentos e ensaios de eficácia de medicamentos (CRUZ et al., 2013).

Para a determinação da carga parasitária, utiliza-se a PCR quantitativa (qPCR), que permite o monitoramento da amplificação empregando marcadores fluorescentes. Tal metodologia permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizados em uma única etapa tornando a técnica extremamente rápida, menos trabalhosa, e com menor risco de contaminação tendo em vista que os tubos permanecem fechados durante todo o processo e dispensa a necessidade de



eletroforese em gel (WORTMANN et al., 2001; WORTMANN et al., 2004). A PCR convencional utiliza a amplificação pela enzima taq DNA polimerase, entretanto a detecção da amplificação em tempo real se baseia na atividade exonucleasica 3'→5' da enzima para ativar a fluorescência de sondas tipo taqman ou pela detecção não específica através da utilização de corantes fluorescentes intercalantes de dupla fita como o Sybr green ou Eva green®. O uso de corantes não específicos para detecção da amplificação diminui os custos da reação tornando-a mais acessível, entretanto torna necessária a realização da curva de dissociação na qual através da variação de temperatura (65°C a 95°C) é possível determinar a temperatura de dissociação dos *primers* e suas seqüências alvo e assim analisar se houve a formação de sub produtos e/ou formação de dímeros de primer.

Esta tecnologia está se tornando disponível em vários países e é recomendável que seja aplicada em laboratórios centrais em países endêmicos para leishmanioses (WEIRATHER et al., 2011).

Para realizar a quantificação existem duas maneiras: a quantificação absoluta e a relativa. A quantificação absoluta permite calcular com exatidão o número de cópias de uma determinada amostra através de uma curva padrão, que também fornece parâmetros da qualidade da reação como eficiência e coeficiente de linearidade. A curva padrão é obtida pela diluição seriada a partir de concentração conhecida de DNA genômico purificado e, para cada concentração da diluição, é gerado um ciclo de quantificação (Cq) correspondente. Ao final da reação tem-se uma reta calculada a partir da relação entre a concentração de DNA obtido e seu respectivo Cq. A reação é considerada aceitável quando o coeficiente de linearidade ( $r^2$ ) da curva é  $\geq 0,98$  e com eficiência entre 90% a 110%. A quantificação relativa geralmente é utilizada para avaliar mudanças na expressão gênica de uma determinada amostra em relação a outra de referência, podendo ser utilizada curva padrão ou  $\Delta\Delta CT(2^{-\Delta\Delta CT})$  método comparativo. Os resultados são expressos em diminuição ou aumento da expressão gênica de um determinado gene em relação ao gene de referência. Neste tipo de estudo geralmente é utilizado um gene normalizador para controle (THERMO FISHER, 2016).

A primeira reação de qPCR para diagnóstico de leishmaniose foi realizada por Wortmann et al., (2001) utilizando o sistema taqman e *primers* direcionados para a região da subunidade menor do RNA Ribossomal. Desde então diversos alvos têm sido utilizados para quantificação de espécies de *Leishmania* por SYBR Green, como microsátélites, sequências teloméricas, DNA polimerase, Glicose-6-fosfato desidrogenase, proteína do choque térmico, miniéxon, “internal transcribed spacer” (ITS), subunidade menor de RNA ribossomal (SSR) e kDNA.

Dentre todos os alvos o mais explorado tem sido o kDNA, uma estrutura presente em todos os seres da ordem dos *Kinetoplastea* e constituem uma rede de DNA mitocondrial no cinetoplasto, organizada em aproximadamente 20-30 maxicirculos (20-40kb) e 10.000-20.000 minicirculos (0,5-2kb), apresentando regiões conservadas intercaladas a regiões variáveis. As regiões conservadas do minicirculo contém três blocos altamente conservados (“conserved sequence blocks” - CSB) que estão divididos em CSB-1, CSB-2 e CSB-3. A região conservada kDNA vem sendo utilizada como alvo molecular de escolha em estudos de avaliação de diversidade genética entre diferentes espécies de *Leishmania* e quantificação de carga parasitária em diferentes amostras clínicas (PRINA et al., 2007; WEIRATHER et al., 2011; JARA et al., 2013; CECARRELI et al., 2014; SUAREZ et al., 2015; PITA-PEREIRA, 2016; OLIVEIRA et al., 2017; GALLUZI et al., 2018; MOUSAVI et al., 2018).

## 2. JUSTIFICATIVA

Na LC as manifestações sistêmicas são limitadas e por conta disso o material para diagnóstico laboratorial deve ser coletado diretamente da lesão cutânea. A orientação da Organização Mundial de Saúde é que o material seja coletado da borda da lesão ulcerada da lesão por considerar que esse é o local com maior densidade parasitária na lesão (TECHNICAL REPORT SERIES, 1990). Entretanto a dispersão dos parasitos na lesão de LC tem sido reavaliada através do emprego de diferentes métodos e diferentes autores têm observado maior densidade parasitária na borda interna e até mesmo no centro da lesão (RAMIREZ et al., 2000; MELLO et al, 2011; ADAMS et al., 2014; SUAREZ et al., 2015). Tais observações podem impactar na escolha do local de coleta de amostras clínicas para o diagnóstico.

Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo, de Mello et al. (2011) avaliaram 110 pacientes com lesão cutânea ulcerada e compararam o exame direto com material obtido por escarificação realizada na borda interna e externa da lesão. Foram considerados positivos, pelo isolamento em cultura, 39 pacientes. A sensibilidade do exame direto nos esfregaços obtidos por escarificação foi de 62,5% na borda interna e 42,5% para o procedimento realizado na borda externa da lesão. As lâminas de escarificação preparadas com material coletado a partir de escarificação da borda interna da lesão quando comparadas com as da borda externa da lesão, de maneira geral, apresentaram maior quantidade de células brancas e menos hemácias permitindo uma melhor visualização do campo microscópico. Tendo em vista esses resultados alguns pontos ainda precisam ser esclarecidos tais como: a maior sensibilidade encontrada no exame direto na borda interna da lesão, poderá ter sido devido a melhor qualidade das preparações ou a maior quantidade de parasitos? A carga parasitária no material coletado por *imprint* é maior que no material coletado pela escarificação? Qual é o melhor local para coleta de amostras para realização de ensaios moleculares? Também é importante conhecer a distribuição celular e parasitária na lesão, pelo exame histopatológico, na borda interna e externa da lesão cutânea ulcerada.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GERAL

Quantificar a carga parasitária em amostras coletadas da borda interna, externa e *imprint* de lesões de LC ulceradas utilizando a técnica de PCR quantitativa e avaliar o perfil de distribuição celular e parasitário na borda interna e externa de lesões de LC ulceradas pelo exame histopatológico

#### 3.2. ESPECÍFICOS

- Padronizar a extração de DNA a partir de lâminas de escarificação e *imprint*
- Descrever a carga parasitária em amostras obtidas pelos procedimentos de escarificação e *imprint*
- Avaliar a concordância dos valores de carga parasitária em amostras obtidas por procedimento de escarificação e por *imprint*
- Descrever os tipos celulares presentes nas bordas da lesão cutânea ulcerada ao exame histopatológico.
- Associar a carga parasitária encontrada do tratamento com o tempo de evolução de lesão, o desfecho clínico e com o número de caselas positivas para formas amastigotas ao exame direto nas lâminas de escarificação e *imprint*.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. DESENHO DO ESTUDO

Análise transversal de um estudo de coorte para avaliação da carga parasitária em amostras obtidas por escarificação da borda interna e externa e por *imprint* de lesão cutânea ulcerada de LC.

### 4.2. LEITURA DAS LÂMINAS DE ESCARIFICAÇÃO E *IMPRINT*

As lâminas de *imprint* e distensão dos escarificados foram fixadas por metanol, coradas pelo Giemsa e lidas em microscópio ótico com aumento de 1000x em objetiva de imersão. A presença de formas amastigotas em cada uma das caselas e o somatório do número de caselas positivas foram registrados durante a leitura microscópica e os resultados foram comparados entre as lâminas de escarificação de BI, escarificação de BE e *imprint*.

### 4.3. CASUÍSTICA

A população foi constituída a partir de uma coorte de pacientes com diagnóstico confirmado de LC, atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses no período de 2009-2010 no Rio de Janeiro, Brasil.

O diagnóstico foi confirmado por isolamento de formas promastigostas de *Leishmania* spp. em cultura. Foram excluídos casos que não foram caracterizados como *Leishmania (Viannia) braziliensis* na eletroforese de enzimas. Segundo estudo anterior conduzido por de Mello et al. (2011), nessa coorte foram obtidos 39 casos confirmados de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Para cada paciente, foi preparada uma lâmina por distensão do material obtido por escarificação de borda interna (BI) e uma lâmina com material de borda externa (BE) da lesão. Também foi preparada uma lâmina de *imprint*, com fragmento tecidual coletado por biópsia realizada no mesmo local escarificado, e uma lâmina para exame histopatológico. Ao todo foram avaliadas 156 lâminas, sendo 39 para cada um dos

quatro testes (escarificação BI, escarificação BE, *imprint* e exame histopatológico). Todas as amostras foram processadas no estudo anterior e encontravam-se estocadas até o presente estudo.

#### 4.4. TAMANHO AMOSTRAL

Trata-se de um estudo transversal de dados de uma coorte e por isso não foi calculado tamanho amostral para o presente estudo. Foram obtidas 39 amostras que atendiam aos critérios de inclusão e exclusão.

#### 4.5. CRITÉRIO DE ELEGIBILIDADE E SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram considerados elegíveis todos os pacientes adultos, apresentando lesões cutâneas ulceradas que tiveram amostras clínicas coletadas para escarificação, cultura, *imprint* e exame histopatológico e com o termo de consentimento livre e esclarecido para coleta dos materiais (anexo 1).

#### 4.6. VARIÁVEIS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS

As informações referentes às variáveis: data de nascimento, sexo, local provável de infecção, tempo de evolução, tratamento e localização da lesão de cada paciente foram recuperadas a partir dos prontuários dos pacientes.

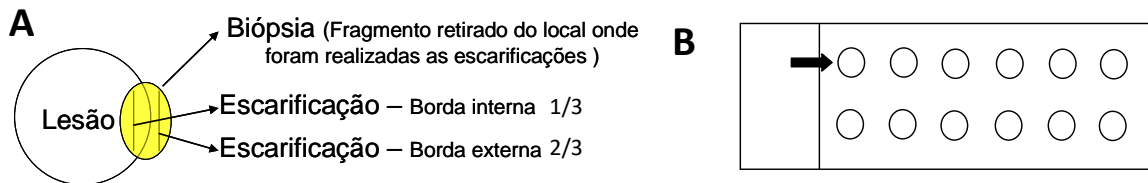
#### 4.7. MATERIAIS, PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS

##### 4.7.1. Coleta de material

Em estudo anterior (de Mello et al., 2011) a escarificação foi realizada nas bordas internas e bordas externas de lesões ulceradas de pacientes com suspeita clínica de LC. Após a realização da escarificação foi realizada a biópsia abrangendo ambos os locais escarificados. Esse fragmento de tecido foi utilizado para preparação do *imprint*, cultura e exame histopatológico. Para preparação da escarificação e *imprint* foram utilizadas lâminas com 12 áreas demarcadas (caselas) e todas as áreas foram

preenchidas com material coletado da lesão, os fragmentos de tecido utilizados na preparação do *imprint* foram obtidos por biópsia com punch 5mm, englobando 2/3 de borda externa e 1/3 de borda interna da lesão (Figura 2 e 3).

**Figura 2:** (A) Representação esquemática dos locais da lesão onde foram realizadas as coletas e (B) lâmina com áreas demarcadas utilizada para preparação da escarificação e *imprint*.



**Fonte:** de Mello et al., 2011

**Figura 3:** Coleta de espécimes clínicos de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. **A:** Escarificação de borda interna e externa da lesão com auxílio de bisturi. **B:** *Imprint* com punch de 5mm.



**Fonte:** Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em leishmanioses.

## 4.7.2. Preparação das curvas padrão

### 4.7.2.1. Cultura de *Leishmania*

Foi utilizada cepa de referência de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) proveniente da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC). Os parasitos foram inoculados em meio Schneider suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1mM/mL de L-glutamina, 200u/mL de penicilina e 200µg/mL de estreptomicina e então armazenados em estufa a 27°C. No segundo dia foi realizado um repique aleatório, que consistiu na retirada de uma pequena alíquota de parasitos do meio de cultura anterior para um novo tubo a fim de selecionar o máximo de parasitos na fase log. No quarto dia foi realizado um repique contado no qual retiraram-se  $1 \times 10^5$  parasitos da cultura anterior em um novo tubo de cultivo. No oitavo dia após a inoculação, foi realizada a lavagem e posterior ressuspensão dos parasitos em 1mL de solução salina tamponada de fosfato (PBS). A contagem dos parasitos foi realizada com auxílio de Câmara de Neubauer e foi retirada uma alíquota contendo  $1 \times 10^7$  parasitos para extração de DNA (ROMÃO et al., 2016).

### 4.7.2.2. Extração de DNA de *Leishmania*

A extração de DNA das alíquotas de cultura de *Leishmania* foi realizada com o uso do kit Qiagen DNeasy blood & Tissue Kit® (Qiagen), segundo recomendações do fabricante, sendo a eluição final realizada em volume de 100µL. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

### 4.7.2.3. Extração de DNA de tecido humano

Para utilização como controle endógeno, foi realizada a extração de DNA humano, proveniente de 24 mg de tecido fresco de doador saudável. A extração foi realizada com o uso do kit Qiagen DNeasy blood & Tissue Kit® (Qiagen), segundo recomendações do fabricante, sendo a eluição final realizada em volume de 100µL e posteriormente armazenadas a -20°C.



### 4.7.3. Padronização da curva padrão

Para quantificação da carga parasitária de *Leishmania*, foram utilizados *primers* direcionados à região conservada do minicírculo kDNA de *Leishmania*. Também foram utilizados *primers* direcionados ao gene endógeno humano  $\beta$ -actina, conforme tabela 1 abaixo:

**Tabela 1:** Sequência de *primers* utilizados para kDNA e  $\beta$ -actina humana

Alvo	Sequência <i>primer</i>	Tamanho amplicon (pb)	Referência
kDNA	F: 5'GAACGGGGTTTCTGTATGC3' R: 5'TACTCCCCGACATGCCTCTG3'	70	(LOPEZ et al., 1993).
$\beta$ -actina	F: 5'TAATGTCACGCACGATTTCCC3' R: 5'TCACCGAGCGCGGCT3'	60	(RODRIGUES et al., 2011).

**Legenda:** Primer F: Forward; Primer R: Reverse

A curva padrão de *Leishmania* foi construída a partir de uma concentração inicial conhecida de  $\times 10^4$  cópias de DNA de cepa referência de *L. (V.) braziliensis*, onde então foram realizadas diluições seriadas na base 10 até o ponto  $\times 10^{-2}$ .

A curva foi validada através de três reações independentes em triplicata, de cada concentração utilizada na curva. Foi realizada a média aritmética dos valores do Cq a fim de estabelecer o Cq de cada ponto da diluição e determinar o coeficiente de linearidade ( $R^2$ ) e eficiência. A curva é aceitável quando os valores de eficiência se encontram entre 90 a 110% e o coeficiente de linearidade acima de 0,98 (BUSTIN, 2014).

### 4.7.4. qPCR

#### 4.7.4.1. Extração de DNA de *Leishmania* sp. presente em lâminas de escarificação e *imprint* de lesões cutâneas ulceradas de LC

Cada lâmina apresentava 12 áreas demarcadas onde foi depositado o material coletado. Para extração do DNA, as lâminas foram limpas suavemente com lenço de papel e toda a extensão da lâmina foi raspada com auxílio de bisturi e placa de petri

estéreis. O material retirado da lâmina foi acondicionado em um tubo eppendorf com a devida identificação. Para cada paciente foi extraído DNA de borda interna e externa. A extração foi realizada utilizando o Kit ChargeSwitch™ Forensic DNA Purification Kit – Thermo Fisher Scientific com as seguintes modificações no protocolo: incubação com os reagentes Lysis buffer e proteinase K a 55°C *overnight* e volume final de eluição de 50µL. O DNA isolado e purificado foi quantificado por fluorimetria utilizando o Qubit Fluorímetro 3.0 e posteriormente armazenado a -20°C.

#### 4.7.4.2. Controle endógeno da reação de qPCR

Para excluir resultados falso-negativos devido à baixa eficiência da extração de DNA ou à presença de inibidores de PCR, foi realizada quantificação do gene  $\beta$ -actina humana de todas as amostras. Como controle dessa reação foi utilizado DNA extraído de 24 mg de tecido fresco de doador saudável com o uso do kit Qiagen DNeasy blood & Tissue Kit® (Qiagen), segundo recomendações do fabricante, sendo a eluição final realizada em volume de 100µL e posteriormente armazenadas a -20°C.

#### 4.7.4.3. Quantificação absoluta da carga parasitária

A quantificação absoluta da carga parasitária foi realizada através da amplificação da região conservada do minicírculo kDNA de *Leishmania*. A qPCR do gene de  $\beta$ -actina humana foi realizada para confirmar a presença de DNA humano da amostra e avaliar a eficiência da extração.

A cada corrida foi realizada a curva padrão de *Leishmania* utilizando as concentrações de  $\times 10^4$  até  $\times 10^{-2}$  em duplicata técnica, as amostras dos pacientes foram diluídas em 1:5, para diminuir a concentração de possíveis inibidores, e realizadas em triplicata técnica. também foram utilizados controles negativos em duplicata, “No Template Control” (NTC – Apenas reagentes da PCR sem DNA).

Para cada amostra, foram utilizados dois *primers* distintos, um direcionado ao alvo *Leishmania* e o outro à  $\beta$ -actina. A qPCR foi realizada utilizando 5µL de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, 0,3µM de cada primer direcionado ao alvo

kDNA, 0,5µM de cada primer direcionado ao gen β-actina e 2,5 µL de DNA em um volume total de 10µL. As reações foram realizadas em poços separados. Foi utilizado o termociclador StepOne® Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e a amplificação realizada conforme a seguir: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a amplificação uma curva de dissociação foi gerada em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 15s, seguida de diminuição da temperatura para 60°C por 1min e posterior aquecimento até 95°C com incremento de 0,5°C/5seg. O cálculo da temperatura de dissociação de cada amplicom foi realizado diretamente pelo software do equipamento. A curva de dissociação tem a finalidade de verificar a especificidade do amplicon e a presença de dímeros.

A carga parasitária de cada amostra foi obtida pela razão entre o número de equivalentes de parasitos obtidos na qPCR e a concentração do DNA total de tecido extraído, multiplicado pelo volume de DNA colocado na placa (2,5µL). Os resultados foram expressos como equivalentes de parasito por µg de tecido de acordo com a fórmula na figura 4.

**Figura 4:** Cálculo da carga parasitária. Resultados expressos em equivalente de parasito por µg de tecido.

$$\frac{Eq \text{ parasitos}}{\mu g \text{ tecido}} = \frac{Quantificação \text{ kDNA}}{Concentração \text{ DNA extraído} * 2,5} * 10^3$$

Só foram consideradas para quantificação amostras cujo Cq se encontraram dentro da faixa quantificável pela curva padrão.

O software integrado ao sistema Stepone® (StepOne Software v2.3) armazena as informações coletadas durante o processo de amplificação, particularmente a intensidade da fluorescência dos corantes e os ciclos realizados, permitindo a análise computadorizada dos resultados. O limiar (“threshold”) foi determinado na etapa de validação da curva padrão buscando o valor de corte (“cut-off”) que apresenta o melhor desempenho. As amostras foram consideradas positivas quando todas as replicatas cruzaram a linha do threshold e atingiram Cq abaixo de 35 ciclos.

#### **4.7.5. Análise Histopatológica**

A amostra coletada foi fixada em formalina tamponada neutra a 10% e processada para emblocamento em parafina. As amostras emblocadas em parafina foram processadas em cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura, com o auxílio de micrótomo, coradas pela hematoxilina-eosina e observadas ao microscópio ótico. Foi realizada uma avaliação das características histopatológicas gerais de cada amostra e das alterações histopatológicas segundo BRASIL, 2006 (quadro 1). Também foi feita análise semiquantitativa dos principais tipos celulares nas bordas interna e externa. Adicionalmente, foi avaliado em aumento de 1000x e no campo microscópico de maior positividade o número de formas amastigotas totais e por vacúolos parasitóforos na borda interna e externa da lesão. O índice parasitário utilizado foi adaptado segundo estudo anterior (QUINTELLA et al., 2011). As variáveis analisadas estão descritas no quadro 1.

**Quadro 1:** Variáveis histopatológicas analisadas em cortes histológicos provenientes de lesão cutânea ulcerada de 39 pacientes com diagnóstico de LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).

<b>Características gerais</b>	
<b>Hiperplasia escamosa pseudoepiteliomatosa (HEPE)</b>	Presente
	Ausente
<b>Úlcera bem caracterizada</b>	Presente
	Ausente
<b>Tecido de Granulação</b>	Presente
	Ausente
<b>Necrose</b>	Presente
	Ausente
<b>Borda interna e borda externa</b>	
<b>Hiperplasia escamosa</b>	0 Ausente
	+ Regular ou Discreto
	++ Irregular
	+++ Pseudoepiteliomatosa
<b>Reação Exsudativa Celular</b>	Inflamação inespecífica
<b>Reação Exsudativa e Necrótica</b>	Inflamação inespecífica com necrose
<b>Reação Exsudativa e Necrótico-Granulomatosa</b>	Inflamação granulomatosa com necrose
<b>Reação Exsudativa e Granulomatosa</b>	Inflamação granulomatosa
<b>Reação Exsudativa e Tuberculóide</b>	Granulomas tuberculóides (grandes, coalescentes, com necrose e células tipo Langerhans)
<b>Reação Exsudativa e Sarcoide</b>	Granulomas sarcóides (nus, arredondados, coesos)
<b>Granuloma bem formado</b>	Granuloma bem delimitado, arredondado ou ovalado, células coesas
<b>Granuloma mal formado</b>	Granuloma mal delimitado, formato irregular, frouxo
<b>Tipos de Necrose</b>	Caseosa
	Liquefativa
	Coagulativa
	Fibrinoide
	Outra

<b>Plasmócitos e Linfócitos</b>	0	Ausente
	+	Pequena quantidade em poucos campos
	++	Moderada quantidade
	+++	Grande quantidade em muitos campos
<b>Neutrófilos</b>	0	Ausentes
	+	Isolados
	++	Pequenos Abscessos
	+++	Grandes Abscessos
<b>Índice Parasitário</b>	0	Ausente
	+	Até 05 amastigotas por corte padrão (4 a 5 mm)
	++	De 06 amastigotas por corte padrão a 05 por campo de imersão (x1000)
	+++	De 06 a 50 amastigotas por campo de imersão
	++++	Mais de 50 amastigotas por campo de imersão

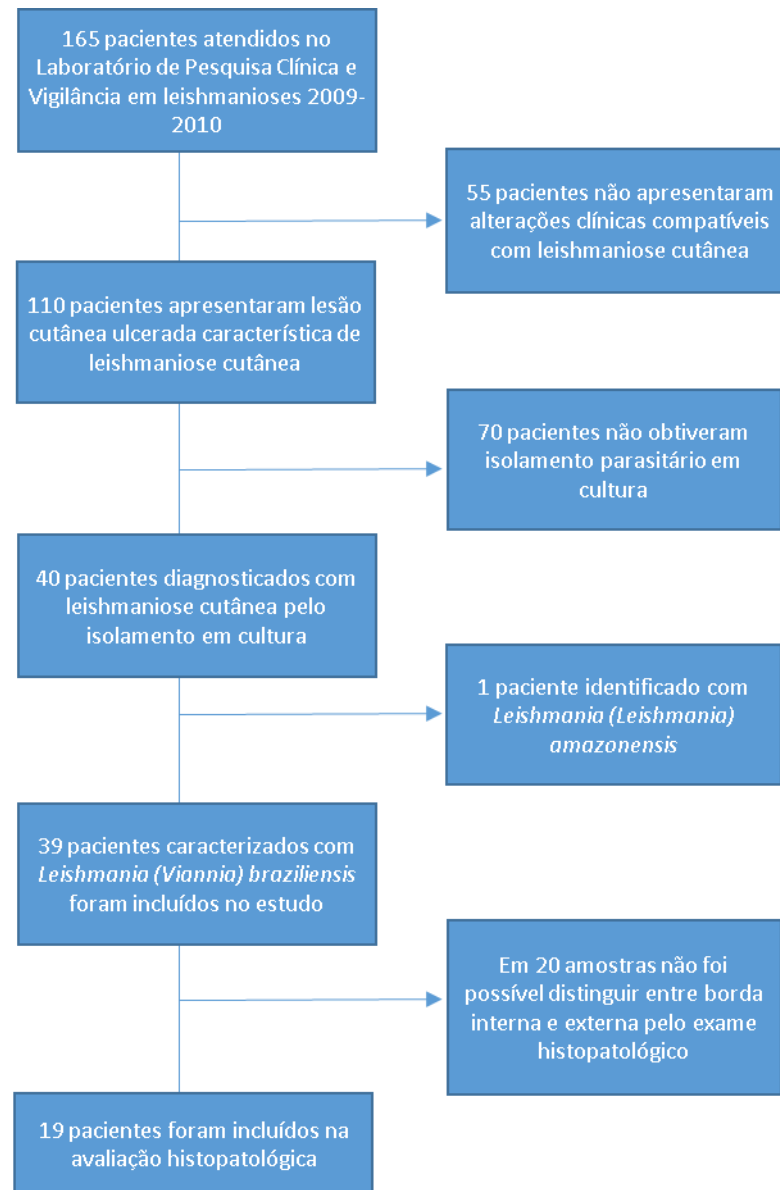
#### 4.8. PLANO DE ANÁLISE

A análise exploratória dos dados foi realizada pela descrição das frequências e proporções para avaliar o desfecho clínico e positividade das caselas e mediana e intervalo interquartilico para carga parasitária e DNA total. A normalidade da variável carga parasitaria foi rejeitada pelo teste de Shapiro-Wilk, o que indicou o uso de testes não paramétricos. Para avaliar se houve diferença significativa entre a carga parasitária na escarificação BI, escarificação BE e *imprint* foi realizado o teste de Friedman e no caso de diferença significativa o teste de Wilcoxon. Foi avaliada também a diferença entre as distribuições da carga parasitária segundo o desfecho clínico (favorável e desfavorável) e tempo de evolução da lesão (até 1 mês, de 1 a 3 meses e acima de 3 meses) pelos testes de Kruskal Wallis e Mann-Whitney. No caso de comparações múltiplas entre borda interna, borda externa e *imprint*, após os testes de Kruskal Wallis e Friedman, utilizou-se a correção de Bonferroni. *P*-valores <0,05 indicaram testes estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad 8.2.0 (© 1992-2019 GraphPad Software, Inc.)

## 5. RESULTADOS

### 5.1. PACIENTES

Foram incluídos no estudo 39 pacientes com diagnóstico confirmado de LC por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e amostras de 19 desses pacientes foram também avaliadas pelo exame histopatológico (Figura 5). Todos os resultados individuais dos 39 pacientes estão descritos no apêndice A.

**Figura 5:** Fluxograma de inclusão/exclusão de pacientes avaliados no estudo

## 5.2. VARIÁVEIS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS

A maioria dos casos representam homens (69,2%), com uma lesão somente (73,4%), em membros superiores (56,4%), com evolução de 1-3 meses (53,5%) e com provável local de infecção no município do Rio de Janeiro (43,6%). As variáveis clínico epidemiológicas estão descritas na Tabela 2:



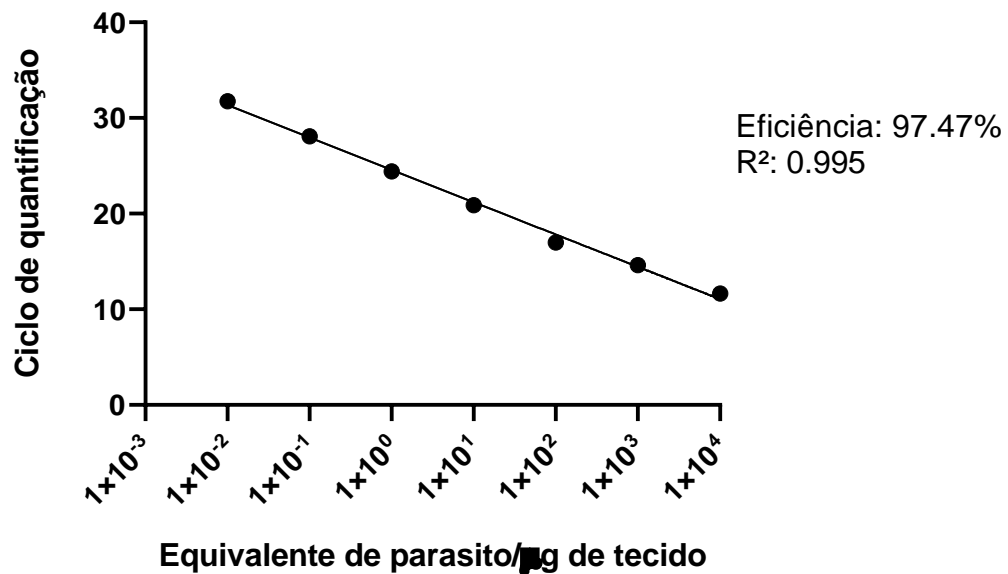
**Tabela 2:** Distribuição das características clínico-epidemiológicas de 39 pacientes com diagnóstico de LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).

<b>Variáveis</b>		<b>Pacientes n=39</b>	<b>%</b>
<b>Sexo</b>	Feminino	12	30,8
	Masculino	27	69,2
<b>Número de lesões</b>	1 Lesão	29	74,3
	1 a 3 lesões	4	10,2
	>3 lesões	6	15,4
<b>Tempo de evolução das lesões</b>	1 mês	5	12,8
	1-3 meses	21	53,8
	Acima de 3 meses	13	33,3
<b>Localização da lesão</b>	Face/pescoço	5	12,8
	Tronco	3	7,69
	Membros superiores	22	56,4
	Membros inferiores	9	23,07
<b>Local provável de infecção</b>	Rio de Janeiro	17	43,6
	Saquarema	8	20,51
	Teresópolis	4	10,2
	São Fidelis	2	5,1
	Bahia/Diuna	1	2,6
	Belford Roxo	1	2,6
	Eunápolis	1	2,6
	Nova Friburgo	1	2,6
	Nova Iguaçu	1	2,6
	Piraí	1	2,6
	Trajano de Morais	1	2,6
Valença	1	2,6	

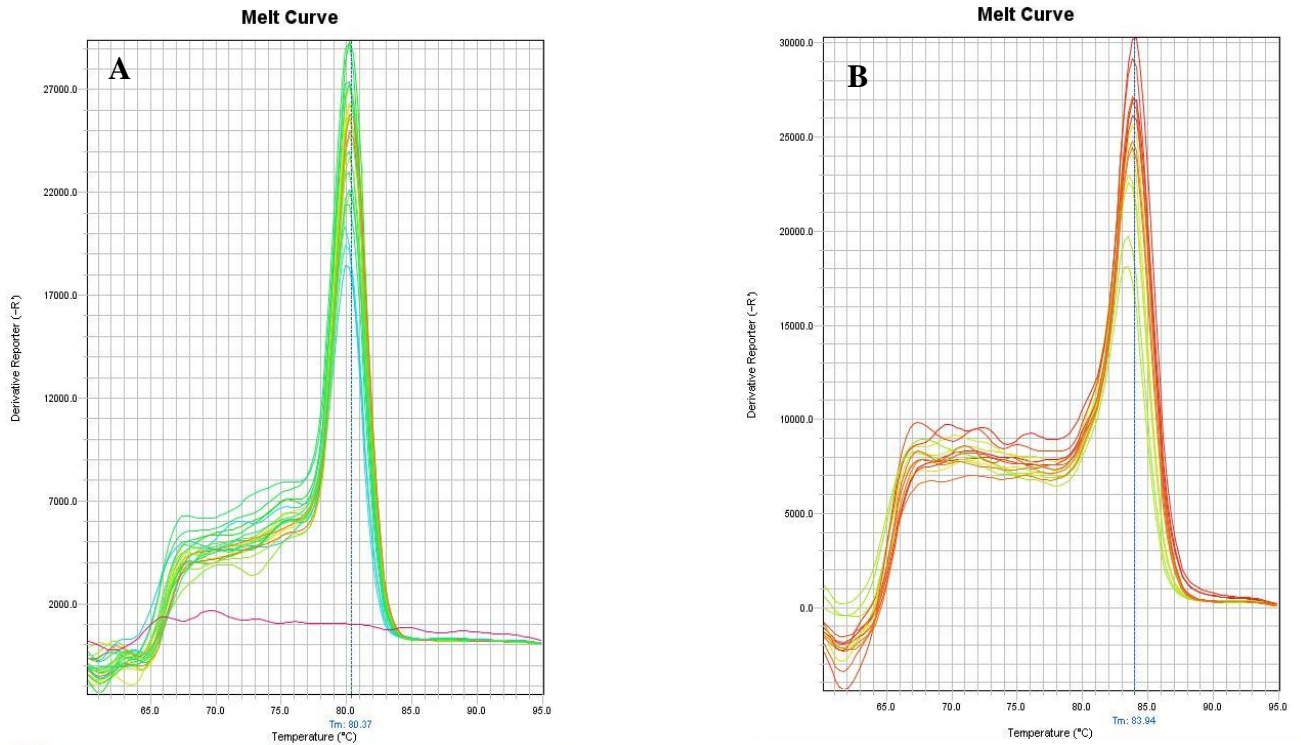
### 5.3. PADRONIZAÇÃO DAS CURVAS PADRÃO

Na validação da curva padrão foi obtida eficiência média de 97,47% [DP: 2,23], Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0.995 [DP: 0,003] (Figura 6). O valor de *threshold* foi estabelecido em 0,05. A temperatura de dissociação foi de 80,37°C para kDNA e 83,94°C para  $\beta$ -actina (Figura 7).

**Figura 6:** Validação da curva padrão de *Leishmania braziliensis* construída a partir de diluições seriadas de  $10^4$  até  $10^{-2}$ .



**Figura 7:** Curva de “Melting” para kDNA (A) e  $\beta$ -actina (B).



#### 5.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA TOTAL EXTRAÍDO DE LÂMINAS ESCARIFICAÇÃO DE BORDA INTERNA E EXTERNA E DE *IMPRINT* DE LESÕES CUTÂNEAS ULCERADAS DE LC

Foi realizada a extração de DNA proveniente de material de uma lâmina de *imprint* e duas lâminas de escarificação por paciente, sendo uma de borda interna e outra de borda externa. O DNA total extraído e purificado a partir destas lâminas foi quantificado por fluorimetria utilizando o Qubit Fluorímetro 3.0®. A quantificação por fluorimetria do DNA total obtido após extração variou de 6,38 a 0,276 ng/μL para borda interna (mediana: 1,542); 1,914 a 0,172 ng/μL para borda externa (Mediana: 0,612); e 4,34 a 0,004 ng/μL para *imprint* (Mediana: 0,42).

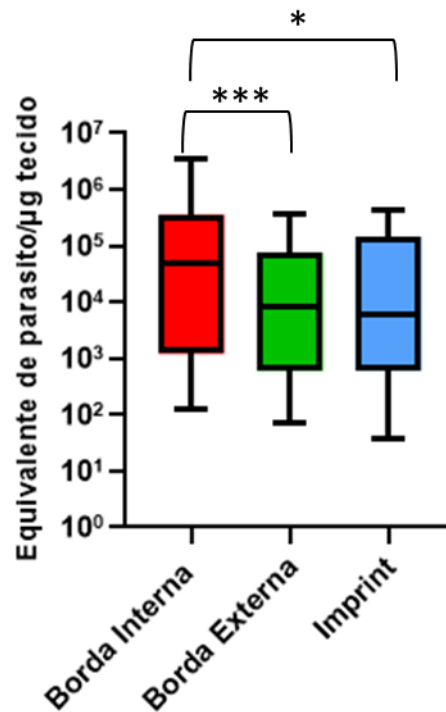
### 5.5. QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DA CARGA PARASITARIA

Foi possível realizar a quantificação absoluta da carga parasitária de todos os 39 pacientes na escarificação de borda interna, borda externa e “imprint” e todas as amostras foram positivas na qPCR para  $\beta$ -actina (Tabela 3). Foi observada maior carga parasitária na borda interna em relação a borda externa e *imprint*. Não houve diferença significativa na carga parasitária de *imprint* em relação a borda externa (Figura 8).

**Tabela 3:** Carga parasitária de escarificação da borda interna, borda externa, e *imprint* de lesões cutâneas ulceradas de 39 pacientes confirmados com LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).

Sítio de lesão	Carga Parasitária		
	Mediana	Valores Interquartílicos (25-75%)	Valores máximo e mínimo
<b>Escarificação Borda Interna</b>	4,91E+04	1,20E+03 - 3,60E+05	1,74E+00 - 5,77E+06
<b>Escarificação Borda Externa</b>	8,61E+03	5,93E+02 - 7,54E+04	3,56E+01 - 4,41E+06
<b><i>Imprint</i></b>	5,93E+03	6,00E+02 - 1,46E+05	2,03E+01 - 7,89E+05

**Figura 8:** Quantificação absoluta da carga parasitária de escarificação da borda interna, borda externa, e *imprint* de lesões cutâneas ulceradas de 39 pacientes confirmados com leishmaniose cutânea, Rio de Janeiro, Brasil, 2009-2010.



**Legenda:** Teste de Friedman  $P < 0,001$ ; Teste de Wilcoxon com correção de Bonferroni: \*\*\* $P < 0,001$ ; \* $P = 0,0029$ .

## 5.6. ASSOCIAÇÃO ENTRE CARGA PARASITÁRIA DE ESCARIFICAÇÃO EM BORDA INTERNA, BORDA EXTERNA E *IMPRINT* E DESFECHO CLÍNICO

O aparecimento de lesão há menos de um mês foi relatado por 5 pacientes, 21 relataram tempo de evolução entre 1 e 3 meses, e 13 pacientes informaram tempo de evolução superior a 3 meses. Não foi observada diferença significativa entre carga parasitária e tempo de evolução de lesão (Teste de Wilcoxon).

Quanto ao desfecho clínico, 28 pacientes apresentaram um desfecho clínico favorável após o tratamento (Cicatrização total), enquanto 8 apresentaram um desfecho clínico desfavorável ao primeiro tratamento (Reativação da lesão). Todos os pacientes foram tratados com glucantime. Carga parasitária elevada na borda interna foi relacionada a desfecho clínico desfavorável ( $P = 0,002$ ; teste de Wilcoxon).

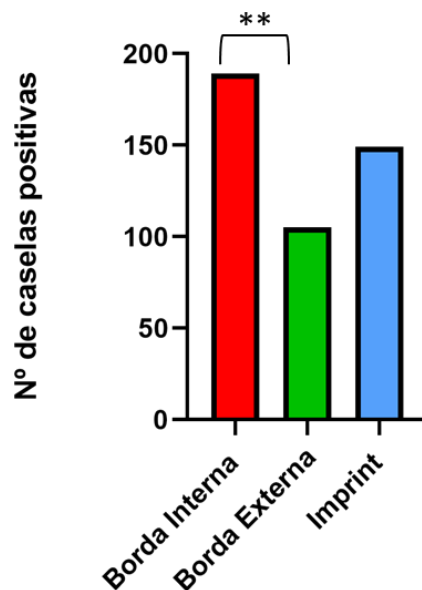
## 5.7. AVALIAÇÃO SEMI QUANTITATIVA DO EXAME DIRETO

Foi realizada a contagem do número de caselas positivas nas lâminas de escarificação de borda interna, externa e *imprint*.

De 39 lâminas avaliadas, foram obtidos 23 (58,9%) resultados positivos na escarificação de borda interna, na borda externa foram obtidos 17 (43,5%) resultados positivos, enquanto amostras de *imprint* apresentaram 27 (69,2%) amostras positivas, (Figura 9).

Com relação ao número de caselas positivas totais, na região de borda interna encontramos um total de 189 caselas positivas, em borda externa 105 caselas positivas, enquanto no *imprint* encontramos 149 caselas positivas.

**Figura 9:** Número de caselas positivas pelo exame direto em *imprint*, borda interna e borda externa (x1000) de lesões cutâneas ulceradas de leishmaniose cutânea de 39 pacientes, Rio de Janeiro, Brasil, 2009-2010.



**Legenda:** Teste de Friedman  $P= 0,0092$ ; Teste de Wilcoxon com correção de Bonferroni:  $**P= 0,0040$ ; **n.s:** Não significativo

## 5.8. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Para todas as características analisadas o mesmo paciente pode apresentar mais de um aspecto histopatológico. A úlcera bem caracterizada e tecido de granulação foram encontrados na maioria dos casos. Houve uma predominância da reação exsudativa granulomatosa e presença de granuloma mal formado nas regiões de BI e BE. Foi observado predominância de necrose caseosa, liquefativa e tuberculóide em BI e necrose coagulativa em BE. Os resultados estão expressos na tabela 4:

**Tabela 4:** Variáveis histopatológicas analisadas em cortes histológicos provenientes de lesão cutânea ulcerada de 39 pacientes com diagnóstico de LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).

Alterações histopatológicas gerais / (n)			
<b>Hiperplasia escamosa pseudoepiteliomatosa</b>	<b>Presente</b>	9	
	<b>Ausente</b>	10	
<b>Úlcera bem caracterizada</b>	<b>Presente</b>	16	
	<b>Ausente</b>	3	
<b>Tecido de granulação</b>	<b>Presente</b>	17	
	<b>Ausente</b>	2	
<b>Necrose</b>	<b>Presente</b>	8	
	<b>Ausente</b>	11	
Alterações histopatológicas por região da lesão			
	Borda Interna (n)	Borda Externa (n)	
<b>Hiperplasia escamosa</b>	<b>0</b>	5	3
	<b>+</b>	3	14
	<b>++</b>	2	2
	<b>+++</b>	9	0
<b>Reação Exsudativa Celular</b>	1	1	
<b>Reação Exsudativa e Necrótica</b>	1	0	
<b>Reação Exsudativa e Necrótico-Granulomatosa</b>	8	3	
<b>Reação Exsudativa e Granulomatosa</b>	18	18	

<b>Reação Exsudativa e Tubercolóide</b>		4	2
<b>Reação Exsudativa e Sarcoide</b>		1	1
<b>Granuloma bem formado</b>		3	1
<b>Granuloma mal formado</b>		18	18
<b>Necrose Caseosa</b>		8	2
<b>Necrose Liquefativa</b>		2	0
<b>Necrose Coagulativa</b>		0	1
<b>Necrose Fibrinóide</b>		6	3
<b>Plasmócitos</b>	<b>0</b>	0	0
	<b>+</b>	0	2
	<b>++</b>	5	6
	<b>+++</b>	10	7
<b>Linfócitos</b>	<b>0</b>	0	0
	<b>+</b>	3	4
	<b>++</b>	6	7
	<b>+++</b>	6	4
<b>Neutrófilos</b>	<b>0</b>	4	8
	<b>+</b>	9	6
	<b>++</b>	2	1
	<b>+++</b>	0	0
<b>Índice Parasitário</b>	<b>0</b>	5	8
	<b>+</b>	3	4
	<b>++</b>	1	1
	<b>+++</b>	6	2
	<b>++++</b>	4	0

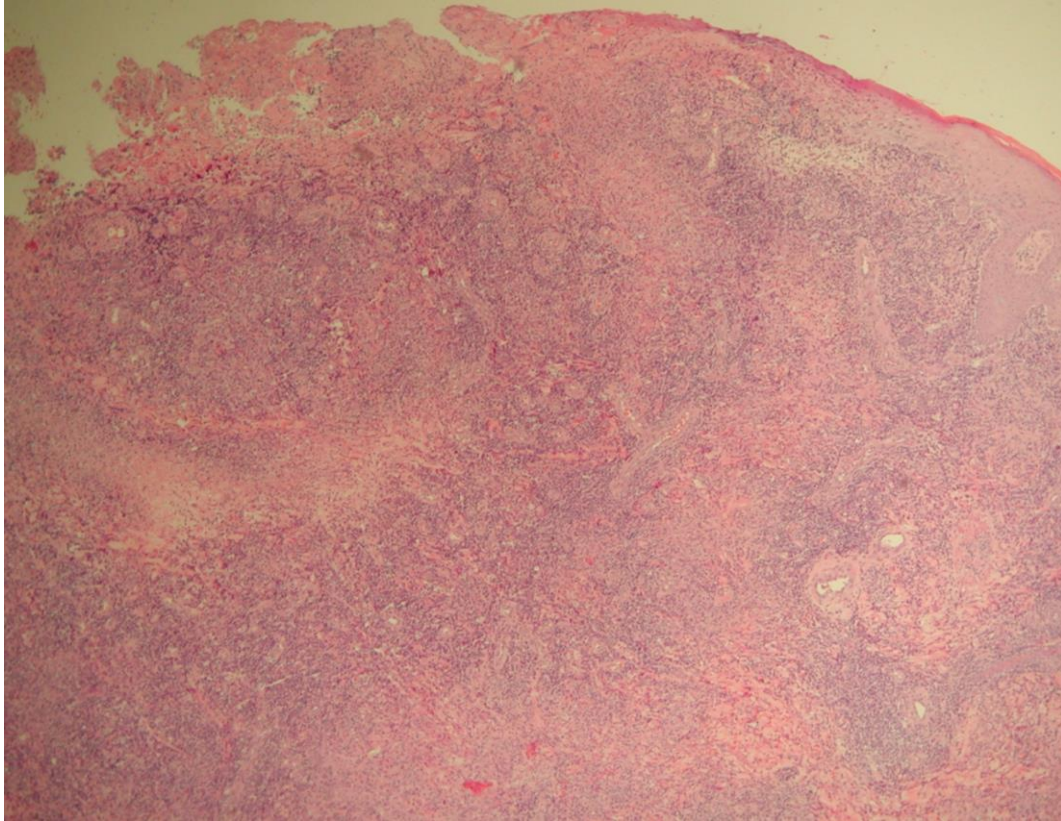
Foi possível visualizar formas amastigotas em 15 lâminas de borda interna e 10 de borda externa conferindo uma sensibilidade de 78% e 52% para o exame histopatológico, respectivamente.

Na avaliação quantitativa de formas amastigotas, o índice parasitário foi maior na borda interna em relação a borda externa ( $P=0,003$ ; teste de Wilcoxon), assim como o número de formas amastigotas por campo ( $P=0,002$ ; teste Wilcoxon) e número de formas amastigotas por vacúolo ( $P=0,006$ ; teste Wilcoxon). Os resultados individuais destas amostras podem ser observados no apêndice F.

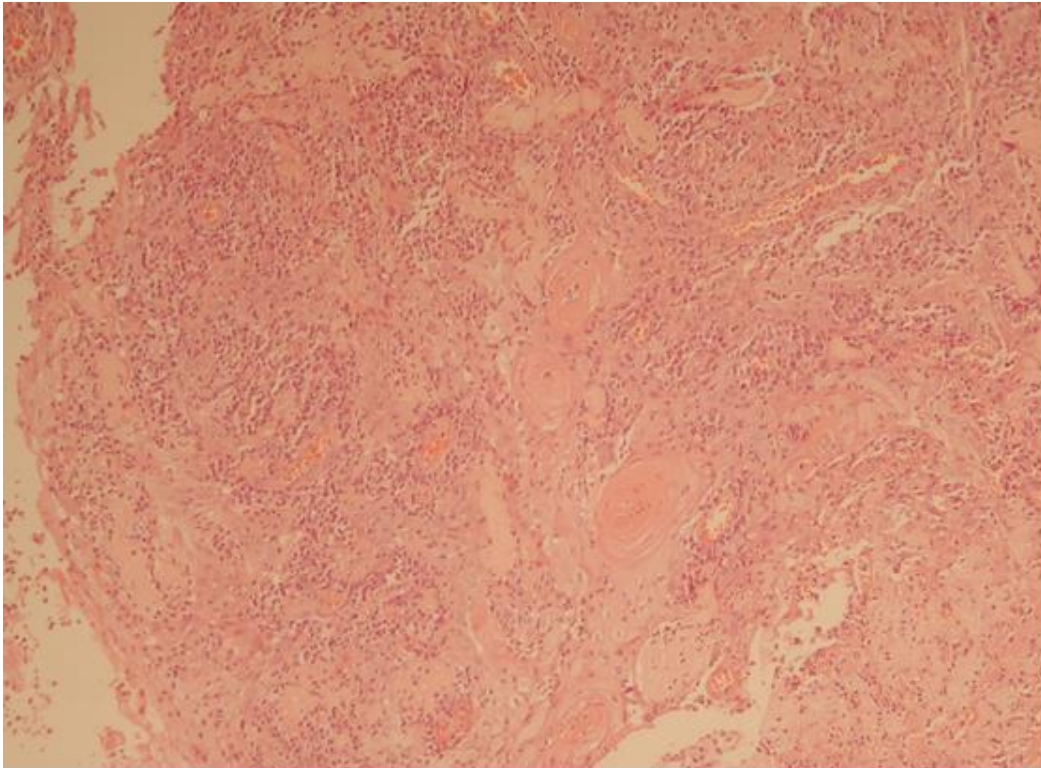


Os principais achados histopatológicos encontradas nas amostras podem ser visualizados nas figuras 10 a 18:

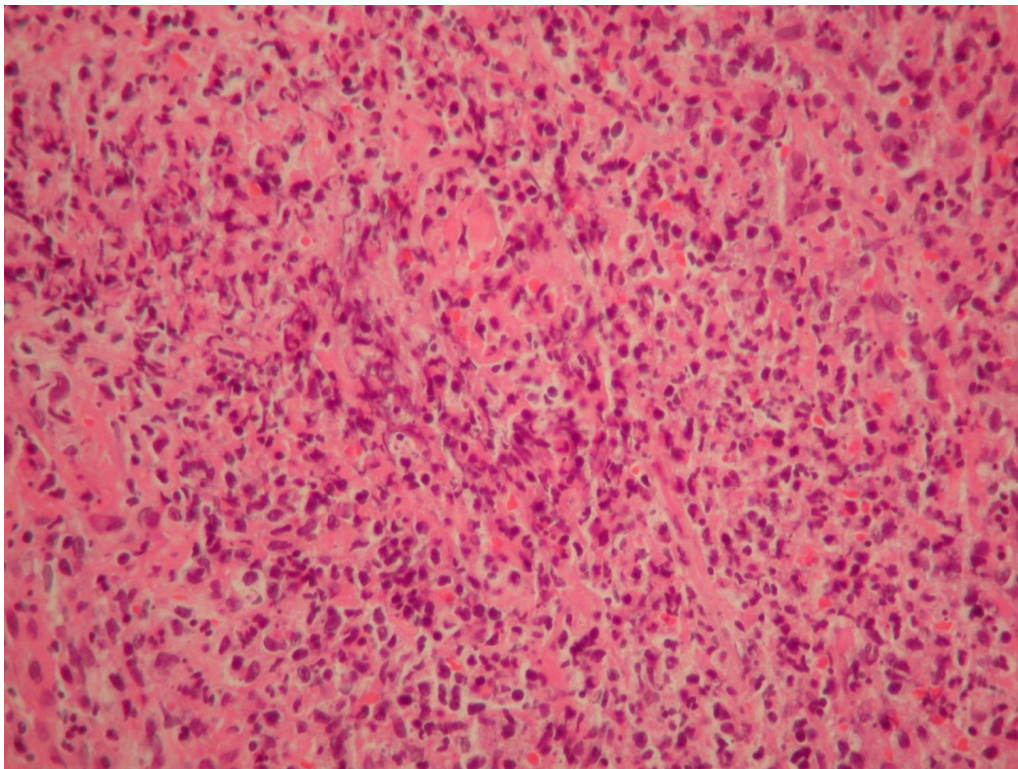
**Figura 10.** Úlcera bem caracterizada – perda do revestimento epitelial, fundo da úlcera com material fibrinoso e necrótico, e logo abaixo, tecido de granulação (proliferação de vasos). HE x 40.



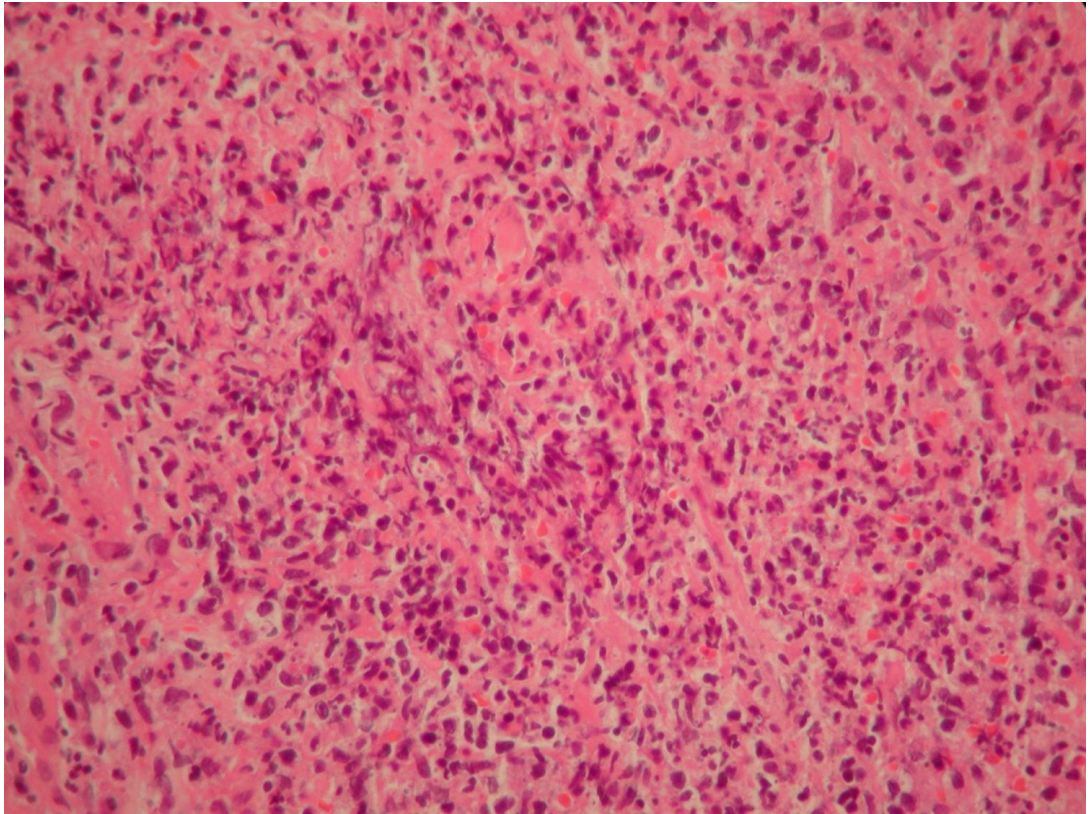
**Figura 11.** Hiperplasia pseudoepiteliomatosa. HE x 100.



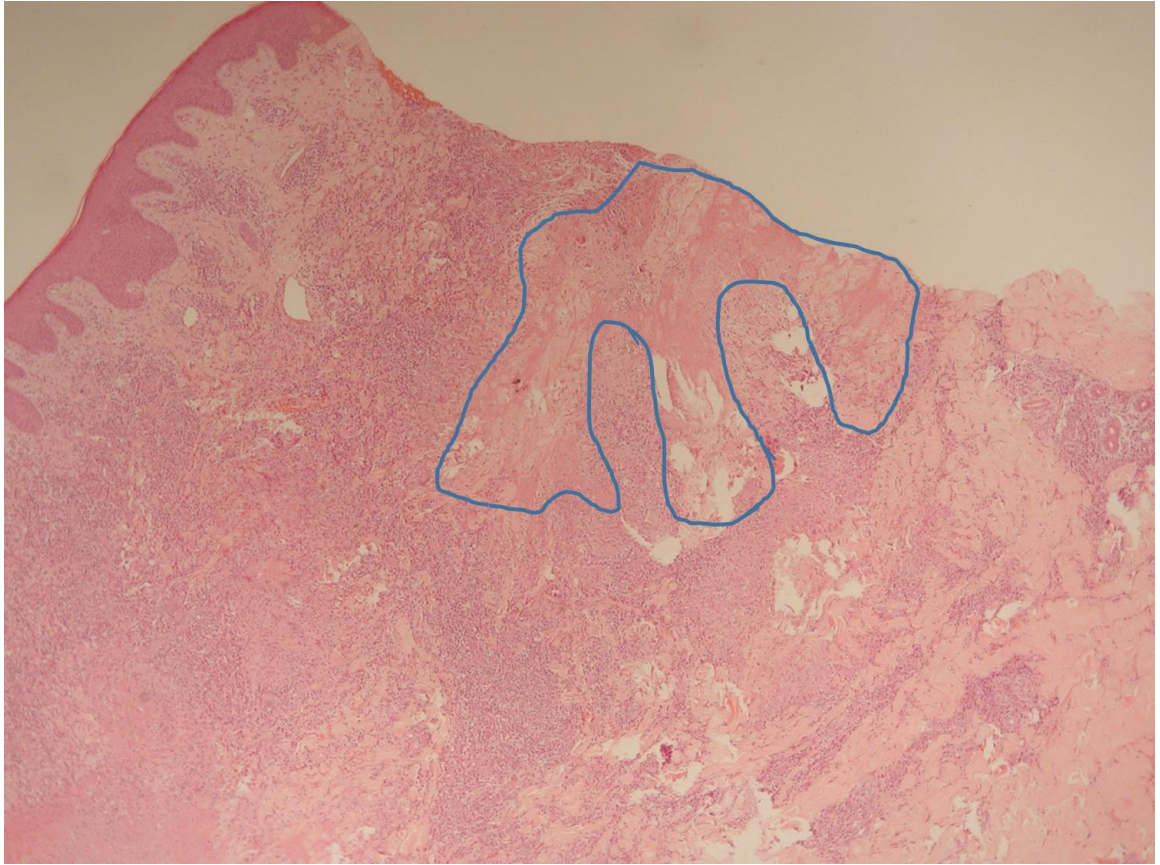
**Figura 12:** Necrose caseosa em granuloma mal formado HE x 100.



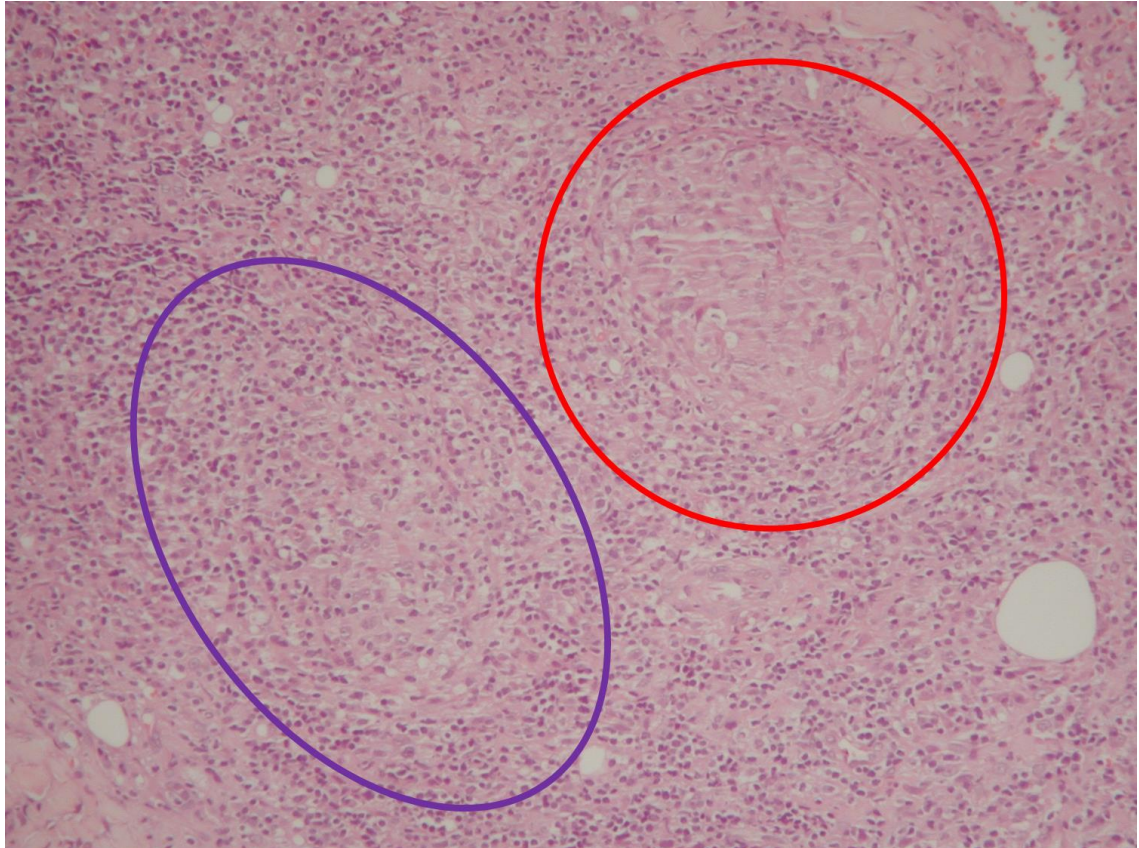
**Figura 13:** Necrose liquefativa. HE x 400.



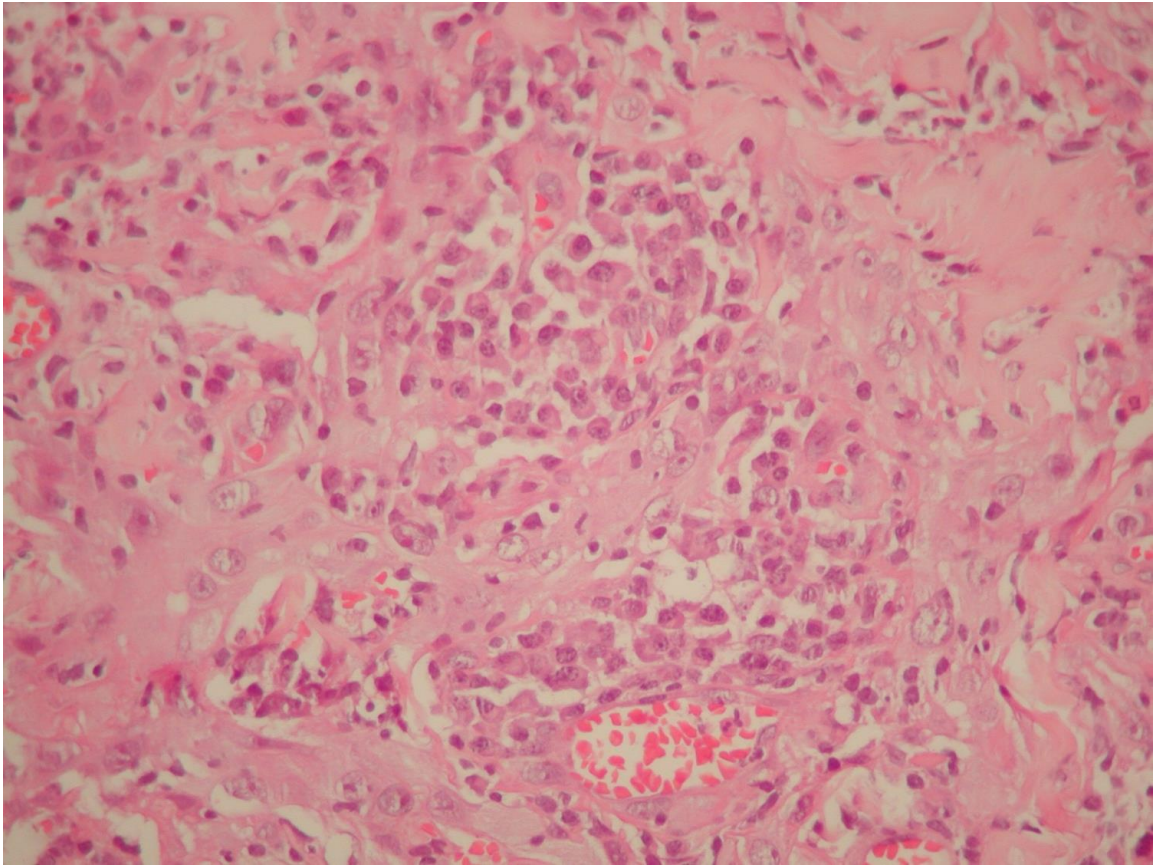
**Figura 14:** Necrose fibrinoide (linha azul). HE x 40.



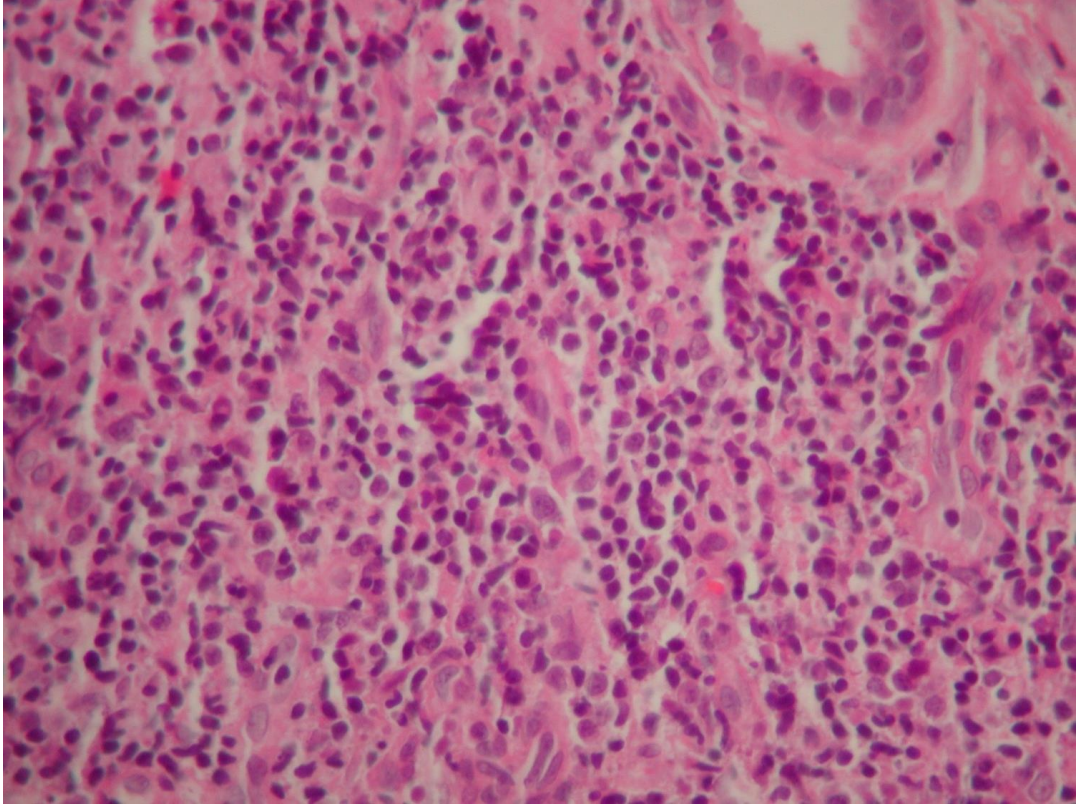
**Figura 15:** Granuloma mal formado (elipse roxa à esquerda) e bem formado (círculo vermelho à direita).  
HE x 400.



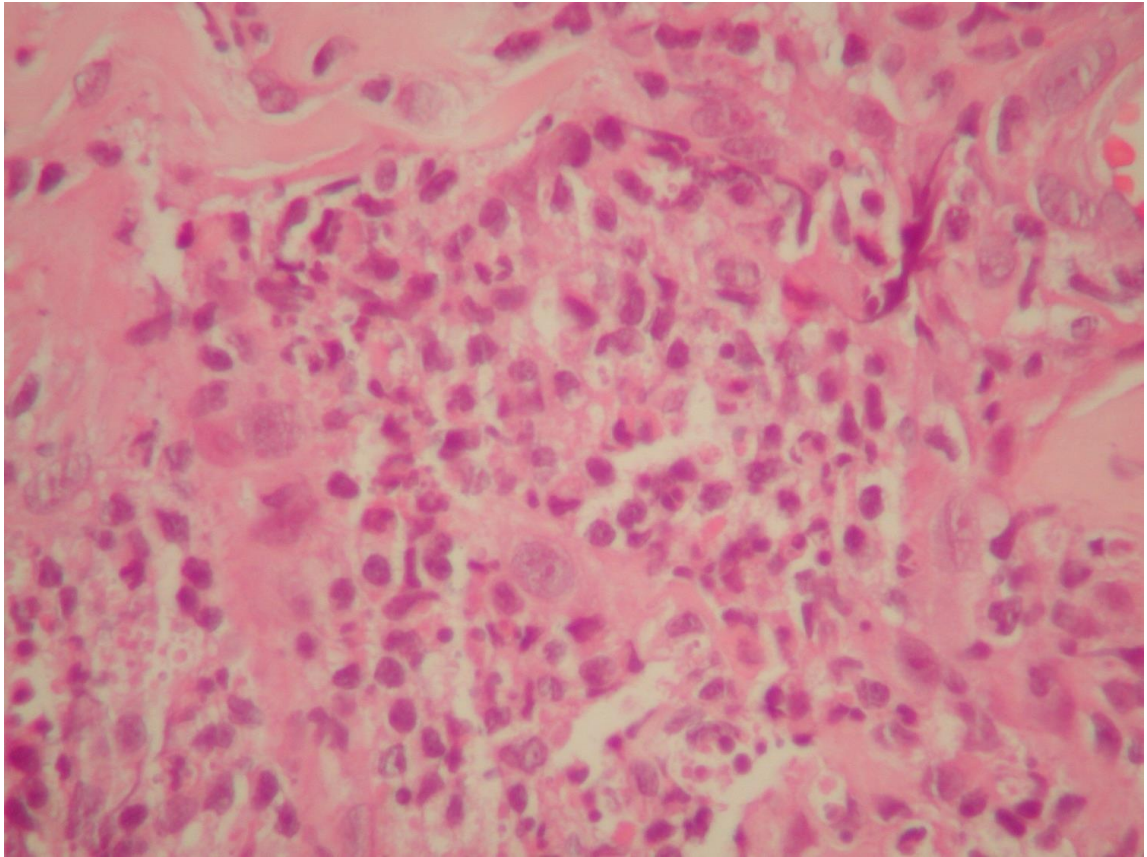
**Figura 16: A.** Plasmócitos +++, em meio a hiperplasia pseudoepiteliomatosa. HE x 400.



**Figura 17:** Linfócitos +++. HE x 400.



**Figura 18:** Neutrófilos + (isolados). HE x 400.





## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo comparamos a carga parasitária de *Leishmania (V.) braziliensis* em amostras provenientes das regiões de borda interna e externa das lesões ulceradas de LC. A escarificação de borda interna apresentou carga parasitária significativamente maior do que as amostras de borda externa e *imprint* pelos métodos de qPCR.

A extração de DNA de *Leishmania* de material clínico proveniente de lâminas de microscopia fixadas e coradas tem sido descrita na literatura e apresenta bons resultados, com amplificação pela PCR convencional e quantitativa, inclusive de lâminas armazenadas por vários anos (VOLPINI et al., 2006; KAZEMI-RAD et al., 2008; KHADEMVATAN et al., 2011). Diferentes métodos foram descritos para realizar a extração de DNA proveniente de material em lâminas coradas pelo Giemsa. Porém, os melhores resultados, com maior rendimento na extração foram obtidos com o uso de protocolos baseados na lise do material a 56°C em proteinase K (MOTAZEDIAN et al., 2002; MA et al., 2006). Em nosso estudo foi possível quantificar DNA de todas as amostras provenientes de lâminas armazenadas há cerca de 10 anos.

Vale ressaltar que todas as lâminas confeccionadas com material de borda interna da lesão apresentaram uma maior concentração de DNA total do que lâminas de borda externa e *imprint* quando quantificadas pelo fluorímetro Qubit®. Isso sugere que na borda interna seja possível coletar uma maior quantidade de material biológico em relação a borda externa como já havia sido evidenciado pelo exame direto (de MELLO et al., 2011). A maior quantidade de DNA total na borda interna não superestima os resultados de carga parasitária obtidos neste estudo, visto que os cálculos para obtenção desses valores foram normalizados pela quantidade de DNA extraído de modo a minimizar diferenças causadas pela quantidade inicial de DNA das amostras, conforme sugerido por Galluzi, 2018.

A escolha dos *primers* a serem utilizados na reação de qPCR é um fator decisivo no sucesso da técnica. Apesar dos *primers* direcionados para o alvo SSR apresentarem melhor especificidade em relação ao kDNA, estes possuem uma menor sensibilidade

devido ao baixo número de cópias presentes no genoma de *Leishmania* (PEREIRA et al., 2017). Pela escassez de material clínico proveniente das lâminas, utilizamos *primers* direcionados para a região conservada do minicírculo kDNA, visto que este alvo contém até 10.000 cópias por amastigota, garantindo uma alta sensibilidade (CECCARELLI et al., 2014). Outros estudos que realizaram a quantificação da carga parasitária de *Leishmania* também utilizaram este alvo (RAMIREZ et al., 2000; JARA et al., 2013; SUAREZ et al., 2015).

De forma geral, para quantificação de carga parasitária de *Leishmania* pela qPCR, é utilizada uma concentração de 10% de DNA por reação (VERMA et al., 2010; JARA et al., 2013). Porém, neste estudo, foi utilizada na reação uma concentração final de DNA de 25%. Outros autores também utilizaram essa concentração por reação em amostras obtidas de fontes escassas em DNA, como material afixado em lâminas e amostras de pacientes com doença de chagas crônica, que cursa com baixa carga parasitária. Isso não alterou a performance da qPCR, como demonstrado pela eficiência próxima a 100% e amplificação do gene da  $\beta$ -actina humana em todas as amostras. (KHADEM VATAN et al., 2011; D'AVILLA et al., 2018).

Com relação ao local de coleta de material na lesão cutânea, o procedimento de escarificação na borda interna apresentou melhor desempenho tanto no exame direto quanto na quantificação da carga parasitária. Alguns autores têm demonstrado maior densidade parasitária na região interna da lesão. Ramirez et al, (2000) já haviam observado por exame direto que, em amostras coletadas do centro da lesão, era possível visualizar amastigotas mais definidas e maiores, mais facilmente identificáveis que as da borda. Também visualizaram pela PCR convencional uma banda mais forte em amostras obtidas do centro da lesão. Adams et al. (2014), avaliaram por qPCR a carga parasitária de amostras obtidas a partir de "swabs" no centro da lesão e aspirados realizados na borda externa com auxílio de uma agulha, tendo as amostras de swab apresentado maior quantificação parasitária.

Quando comparada com o *imprint*, a carga parasitária em amostras provenientes de escarificação de borda interna também foi maior. Entretanto, não foi observada

diferença estatisticamente significativa na comparação da carga parasitária entre amostras de escarificação na borda externa e *imprint*. Estes resultados poderiam ser explicados pela maneira como os fragmentos de tecido utilizados na preparação do *imprint* são obtidos, por biópsia com punch 5mm englobando 2/3 de borda externa e 1/3 de borda interna da lesão (protocolo clínico – Instituto Nacional de Infectologia / INI).

Assim como de Mello et al. 2012, utilizando o exame direto, aqui também não observamos diferença entre tempo de evolução e carga parasitária, entretanto encontramos associação significativa entre maior carga parasitária em BI com desfecho clínico desfavorável, de acordo com os resultados obtidos por Pereira et al, 2017, que observou uma maior carga parasitária em pacientes com reativação da lesão.

Diferentes tipos de coleta de espécimes clínicos têm sido avaliados com relação a sensibilidade. Suarez et al. (2015) compararam a carga parasitária na borda externa, borda interna e centro da lesão pelos métodos de *imprint*, escarificação e escova citológica. Os autores encontraram maior carga parasitária na borda interna e no centro da lesão, em amostras obtidas por escarificação e por escova citológica em relação ao *imprint* realizado nos mesmos locais.

Sevillha et al, (2018), empregando a qPCR, descreveram uma quantidade maior de DNA parasitário na epiderme e na derme superior em relação à derme inferior e hipoderme. Adicionalmente, a sensibilidade foi significativamente superior nas amostras da derme superior quando comparadas à hipoderme. Neste contexto, a escarificação na borda interna, em região onde não há mais a presença de epiderme, pode ser um fator adicional para o encontro de maior carga parasitária em relação ao *imprint*, visto que este método coleta fragmentos de regiões mais profundas da pele, pobres em parasitos.

A maior carga parasitária obtida pela escarificação de borda interna em relação ao *imprint* é um achado importante, considerando que o *imprint* é um procedimento que necessita da realização de biópsia, um procedimento cirúrgico privativo do profissional médico, e que envolve anestesia e sutura. Por conta disso sua aplicação em áreas

endêmicas torna-se pouco prática. Neste contexto, a escarificação da borda interna é uma alternativa simples, pouco invasiva, que não requer anestesia, e pode ser realizada por profissional não médico na rotina de diagnóstico (de MELLO et al., 2011). A partir de todas essas considerações os resultados aqui apresentados sugerem que materiais provenientes da borda interna são os mais adequados para o diagnóstico molecular.

Em geral, amostras com alta carga parasitária apresentaram maior quantidade de caselas positivas pelo exame microscópico. Paradoxalmente, o *imprint* apresentou menor carga parasitária na qPCR em relação à escarificação da borda interna mas uma maior sensibilidade do que a escarificação de borda interna pelo exame microscópico. A maior sensibilidade do *imprint* à microscopia pode ser devida ao fato que as amostras de tecido utilizadas no *imprint* são submetidas previamente à limpeza com gaze estéril para retirada do excesso de sangue. Esse procedimento poderia explicar a visualização mais fácil de formas amastigotas nas lâminas de *imprint* quando comparadas com as lâminas confeccionadas com esfregaço de material obtido por escarificação. Estas últimas costumam apresentar debris celulares e hemácias que dificultam a leitura, principalmente as lâminas confeccionadas com material obtido por escarificação de borda externa da lesão (MELLO et al., 2011; BRASIL, 2017). Outra possibilidade é alta taxa DNA humano x DNA parasitário nessas amostras como apontado por alguns autores (GARCIA et al., 2007).

Até onde sabemos, este foi o primeiro estudo a comparar, pelo exame histopatológico, os tipos celulares, alterações histopatológicas e número de formas amastigotas de *L.(V.) braziliensis* em borda interna e externa da lesão cutânea ulcerada. As alterações histopatológicas aqui observadas foram compatíveis com as descritas na literatura (MAGALHÃES et al., 1986).

A necrose dos tecidos infectados é um importante mecanismo de defesa na patogenia da LC (ANDRADE et al., 1984; MARTINS et al., 2014), e em nosso estudo observamos mais casos de necrose na borda interna e estas foram principalmente dos tipos caseosa e fibrinoide. A presença de necrose caseosa nos cortes histológicos é

fortemente associada à tuberculose, também podendo ser causada por algumas doenças fúngicas, portanto a presença deste tipo de necrose em pacientes com LC pode direcionar o médico a um diagnóstico equivocado, especialmente em amostras com baixa carga parasitária, devido a dificuldade em encontrar formas amastigotas (ADIGUN R; BASIT H; MURRAY J, 2019). A presença de necrose caseosa em pacientes acometidos por LC também tem sido relatada por outros autores (ANDRADE et al., 1984; PELTIER et al., 1996).

Como citado anteriormente, a necrose é definida como um processo de eliminação de formas amastigotas pela destruição dos macrófagos (RIDLEY & RIDLEY, 1984). Entretanto, alguns autores relacionam a presença de necrose com a presença de amastigotas (PALMA et al., 1991). No nosso estudo, a maior presença de necrose concomitantemente com maior índice parasitário foi na borda interna.

Assim como no estudo de Magalhães et al., (1986), a alteração histopatológica predominante foi a reação exsudativa e granulomatosa, que tem sido relacionada ao melhor prognóstico da doença. É importante ressaltar que foram visualizados mais alterações morfológicas na borda interna (n=32) do que na borda externa (n=24) da lesão, o que poderia indicar esse local como mais adequado também para realização do exame histopatológico. Em relação à presença de formas amastigotas a sensibilidade do exame histopatológico na borda interna (78%) foi comparável a do *imprint* (70%) conforme observado por de Mello et al., 2012, provavelmente por serem técnicas realizadas com o mesmo espécime clínico.

Os neutrófilos têm uma função dupla no estabelecimento da infecção. São as primeiras células efetoras do sistema imune inato, e por não destruírem completamente as formas amastigotas quando entram em apoptose, permitem a fagocitose por macrófagos dos parasitos onde podem sobreviver e se multiplicar. Por isso os neutrófilos têm sido chamados de cavalos de tróia na infecção por *Leishmania* sp. (RIDLEY & RIDLEY, 1984). No nosso estudo, essas células foram encontradas em índice semelhante em ambos os locais avaliados e em baixa intensidade segundo o esperado para o tempo de evolução das lesões avaliadas. O número de plasmócitos e

linfócitos aumenta segundo o desenvolvimento da lesão, por isso observamos maiores intensidades também como esperado para o tempo de evolução das lesões avaliadas. Os plasmócitos têm sido correlacionados com maior número de formas amastigotas (MARTINS et al., 2014). Em nosso estudo, observamos um maior índice parasitário e número de plasmócitos na região da borda interna da lesão, corroborando todos os outros achados. Uma das limitações deste trabalho foi o pequeno número de amostras avaliadas pelo exame histopatológico, devido à impossibilidade de distinção entre borda interna e borda externa em algumas preparações. Futuros estudos de amostras coletadas de borda interna e externa separadamente para serem avaliadas pelo exame histopatológico devem ser realizados a fim de aprofundar os conhecimentos da distribuição parasitária na lesão.

Os resultados aqui apresentados sugerem que amostras coletadas por escarificação da borda interna de lesão de LC ulceradas são as mais adequadas para a utilização na rotina, tanto para o diagnóstico molecular quanto para o exame direto.

## 7. CONCLUSÕES

- Foi possível extrair DNA purificado de todas as lâminas de escarificação de borda interna, borda externa e *imprint*. Amostras provenientes de escarificação de borda interna apresentaram maior concentração de DNA extraído.
- Foi possível quantificar todas as amostras pela qPCR. As amostras clínicas provenientes de escarificação de borda interna apresentaram maior carga parasitária em relação às amostras clínicas provenientes de escarificação de borda externa e *imprint*. Não houve diferença significativa entre amostras provenientes de escarificação de borda externa e *imprint*.
- Pelo exame histopatológico foi encontrado um maior índice parasitário e uma maior quantidade de plasmócitos na região da borda interna da lesão em relação à externa, com diferença estatisticamente significativa. Foi observada também um maior quantidade de necrose na região interna da lesão.
- Pacientes com desfecho clínico desfavorável apresentaram correlação significativa com maior carga parasitária na borda interna da lesão. Não houve diferença significativa entre tempo de evolução e carga parasitária.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E. R. et al. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. **Parasitology**, v. 141, n. 14, p. 1891–1897, 2014.

ADIGUN R, BASIT H, MURRAY J. NECROSIS, Cell (Liquefactive, Coagulative, Caseous, Fat, Fibrinoid, and Gangrenous) In: StatPearls [Internet], **Treasure Island (FL)**, StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430935/>

ANDRADE, Z. A. et al. Patogenia da leishmaniose cutânea experimental: a importância da necrose na eliminação dos parasitos das lesões. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 17, n. 4, p. 187–197, dez. 1984.

BOER, A. et al. Unusual histopathological features of cutaneous leishmaniasis identified by polymerase chain reaction specific for *Leishmania* on paraffin-embedded skin biopsies. **British Journal of Dermatology**, v. 155, n. 4, p. 815–819, out. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana, Secretaria de vigilância em saúde**. Brasília, DF, 2006

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, Secretaria de Vigilância em Saúde**. Brasília, DF, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Ofício nº 3518/2015-SVS/MS**. BRASÍLIA, DF, 2015.

BRYCESON, A. D. M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia I. The clinical and histological features of the disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 6, p. 708–737, jan. 1969.

BUSTIN, S.A. **A-Z of Quantitative PCR**. Portland: International University Line, 2004.

CATALDO, JI. et al. Favorable responses to treatment with 5 mg SbV/kg/day meglumine antimoniate in patients with American tegumentary leishmaniasis acquired in different Brazilian regions. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 51, n. 6, p 769-780, 2018.

CECCARELLI, M. et al. Detection and characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88845, 2014.



- 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, n. 6, p. 1819–1823, 1999.
- CRUZ, I. et al. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 281–289, 2013.
- D'ÁVILA, D. A. et al. Monitoring the parasite load in chronic Chagas disease patients: comparison between blood culture and quantitative real time PCR. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0208133, 29 nov. 2018.
- DE LIMA BARROS, M. B. et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio De Janeiro. **Acta Tropica**, v. 93, n. 1, p. 41–47, jan. 2005.
- DE MELLO, C.X. **Avaliação da contribuição dos exames diretos para o diagnóstico das leishmanioses**. 2015 Tese (Doutorado em ciencias da saúde) 96f-Instituto Nacional de Infectologia, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.
- DE MELLO, C. X. et al. Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology Research**, v. 109, n. 3, p. 927–933, 2011.
- DUQUE, M. C. O. et al. Comparison between systemic and intralesional meglumine antimoniate therapy in a primary health care unit. **Acta Tropica**. v.193, p. 176-182, 2019.
- FAGUNDES, A. et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 1, p. 109–112, fev. 2010.
- FIEBIG, M.; KELLY, S.; GLUENZ, E. Comparative Life Cycle Transcriptomics Revises *Leishmania mexicana* Genome Annotation and Links a Chromosome Duplication with Parasitism of Vertebrates. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 10, p. 1–28, 2015.
- GALLUZZI, L. et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 273, dez. 2018.
- GARCIA, A. L. et al. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 4, p. 368–371, abr. 2007.

GONZÁLEZ, K. et al. Histopathological characteristics of cutaneous lesions caused by *Leishmania Viannia panamensis* in Panama. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, n. 0, 15 fev. 2018.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1–23, 2011.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: differential diagnosis, diagnosis, histopathology and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911–926, dez. 2015.

JOHN, B.; HUNTER, C. A. IMMUNOLOGY: Neutrophil Soldiers or Trojan Horses? **Science**, v. 321, n. 5891, p. 917–918, 15 ago. 2008.

JARA, M. et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: Exploratory study of parasite load and clinical parameters. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1826–1833, 2013.

KAZEMI-RAD, E. et al. Diagnosis and Characterization of *Leishmania* Species in Giemsa-Stained slides by PCR-RFLP. **Iranian J Publ Health**, v. 37, p. 54-60, 2008.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, jul. 2015.

KHADEM VATAN, S. et al. Diagnosis and identification of *Leishmania spp.* from Giemsa-stained slides, by real-time PCR and melting curve analysis in south-west of Iran. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 105, n. 8, p. 559–565, dez. 2011.

LOPEZ, M. et al. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.49. p.348–356, 1993.

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

MA, G. et al. Pilot study of DNA extraction from archival unstained bone marrow slides: comparison of three rapid methods. p. 4, 2006.

MAGALHÃES, A. V. DE et al. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*: 4. Classificação histopatológica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 6, p. 421–430, dez. 1986

MALCHIODI, E. L. et al. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp*; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). **Clinical & Experimental Immunology**, v. 97, n. 3, p. 417–423, 28 jun. 2008.

MARTINS, A. L. G. P. et al. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 1, p. 52–58, jan. 2014.

MOTAZEDIAN, H. et al. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 31–34, jan. 2002.

MOUSAVI T, SHOKOHI S, ABDI J, NASERIFAR R, AHMADI M, MIRZAEI A. Determination of genetic diversity of *Leishmania* species using mini-circle kDNA, in Iran-Iraq countries border. **Trop Parasitol**, v.8, n.2, p. 77-82, dec 2018.

OLIVEIRA-NETO, M. et al. High and low doses of antimony (Sb v) in American cutaneous leishmaniasis: a five years follow-up study of 15 patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 2, p. 207–209, abr. 1996.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C. et al. Clinical and laboratory profiles of patients with early spontaneous healing in cutaneous localized leishmaniasis: a historical cohort study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 559-66, 2017.

Organização Mundial de Saúde. Control of the leishmaniasis: report of WHO Expert Committee. Series WHO 793: 139-158, 1990.

Organização Mundial de Saúde. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization, 2010.

PELTIER, E. et al. Caseous necrosis in cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 49, n. 6, p. 517–519, 1 jun. 1996.

PEREIRA LO, MOREIRA RB, DE OLIVEIRA MP, REIS SO, DE OLIVEIRA NETO MP, PIRMEZ C. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* parasite load associated with disease pathogenesis? **Int J Infect Dis**. v57:132-137, 2017.

PRINA, E. et al. Leishmania DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 11, p. 1307–1315, 2007.

QUINTELLA, L. P. et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 38, n. 1, p. 25–32, jan. 2011.

QUINTELLA, L. P. et al. Proposal of a histopathological predictive rule for the differential diagnosis between American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions: Distinguishing between ATL and sporotrichosis. **British Journal of Dermatology**, v. 167, n. 4, p. 837–846, out. 2012.

RAMIREZ, J.B. et al. Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia : the Sampling Site within Lesions Influences the Sensitivity of Parasitologic Diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3768–3773, 2000.

RIDLEY, M. J.; RIDLEY, D. S. Cutaneous leishmaniasis: immune complex formation and necrosis in the acute phase. **The British Journal of Experimental Pathology**. p. 327-336, 1984.

RODRIGUES, K. M. P. et al. Influence of the Notch system in the therapeutic response of American tegumentary leishmaniasis. **British Journal of Dermatology**, v. 164, n. 6, p. 1228–1234, 2011.

RIBEIRO-ROMÃO, R. P. et al. Development of real-time PCR assays for evaluation of immune response and parasite load in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 361, dez. 2016.  
Ross R, Further notes on Leishman bodies. **Brit Med J**. v.28,:p 1401, 1903.

SAHEKI, M. N. et al. Low versus high dose of antimony for American cutaneous leishmaniasis: A randomized controlled blind non-inferiority trial in Rio de Janeiro, Brazil. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0178592, 30 maio 2017.

SCHUBACH, A. DE O. et al. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 213–217, jun. 2005.

SEVILHA-SANTOS, L. et al. Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 2, p. 242–247, fev. 2019.

SILVA, O.D. Sobre a leishmaniose tegumentar e seu tratamento. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 7, n. 2, p. 213-48, 1915.

STEVEDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, dez. 2017.

SUÁREZ, M. et al. Quantification of *Leishmania* (*Viannia*) kinetoplast DNA in ulcers of cutaneous leishmaniasis reveals inter-site and intersampling variability in parasite load. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. 1–14, 2015.

SZARGIKI, R. Comparison of Serological and Parasitological Methods for Cutaneous Leishmaniasis Diagnosis in the State of Paraná, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47-52, 2009.

THERMO FISHER, 2014 Real-time PCR 3<sup>rd</sup> **Edition manual**.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, 26 maio 2017.

VERMA, S. et al. Quantification of Parasite Load in Clinical Samples of Leishmaniasis Patients: IL-10 Level Correlates with Parasite Load in Visceral Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10107, 9 abr. 2010.

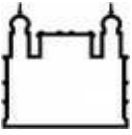
VOLPINI, Â. C. et al. Leishmania identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 8, p. 815–818, ago. 2006.

WEIRATHER, J. L. et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania spp.* in human samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3892–3904, 2011.

WORTMANN, G. et al. Rapid diagnosis of Leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 583–587, 2001.

WORTMANN, G. W. et al. Real-time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panama from both fresh and frozen tissue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 148–151, 2004.

## ANEXOS



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

✓

✓ **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - LTA<sup>1</sup>**

**INSTITUIÇÃO:** Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) – Fiocruz

**COORDENADOR DA PESQUISA:** ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH

**ENDEREÇO:** Av. Brasil 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP 21040-900

**TELEFONES** (0xx21) 3865-9525 / 3865-9609      TEL/FAX (0xx21) 3865-9541

✓ **NOME DO PROJETO DE PESQUISA:** Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com leishmanioses no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - Fiocruz

**NOME** **DO** **VOLUNTÁRIO:**

---

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença causada por parasitos chamados leishmânias. A doença é transmitida pelo "mosquito palha", que vive em regiões de mata, plantações de banana, manga etc. Às vezes ele entra nas casas para se alimentar de sangue de pessoas e animais domésticos. A LTA é uma doença em que geralmente aparecem uma ou mais feridas na pele que demoram muito para fechar. A LTA pode afetar o nariz, a boca e a garganta, ao mesmo tempo em que a ferida está na pele, ou até anos após a sua cicatrização. Não sabemos ainda qual paciente adoecerá de novo e qual permanecerá curado definitivamente.

Outras doenças podem se parecer com a LTA e precisam ser diferenciadas para que se possa fazer o tratamento correto.

No momento, várias perguntas precisam ser respondidas: de que maneiras diferentes pode acontecer a LTA? Como são os exames de laboratório antes, durante e após o tratamento? Quais pacientes, mesmo após o tratamento, irão reabrir suas feridas

---

<sup>1</sup> 1ª via: Prontuário Médico

2ª via: Participante

ou irão ter a doença dentro do nariz, boca ou garganta? Que outras doenças parecidas são confundidas com a LTA e quais exames podemos usar para diferenciar entre elas? Os seres humanos podem transmitir a leishmânia para o mosquito-palha, se forem picados por ele? Quais as melhores formas de tratamento? Como podemos diminuir o número de pessoas que ficam doentes com LTA?

Neste documento, você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa para:

- ✓ descrever como é a doença, e como são os exames de laboratório em quem tem LTA;
- ✓ avaliar o uso dos remédios usados no tratamento da LTA;
- ✓ estudar as leishmânias causadoras da LTA de diversas localidades.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você poderá recusar-se a participar de uma ou todas as etapas da pesquisa. Você pode também sair dela a qualquer momento, sem que isso lhe venha a causar qualquer penalidade por parte da Instituição. O seu atendimento médico não será prejudicado caso você decida não participar ou caso decida sair do estudo já iniciado. Se você deixar de participar deste estudo por qualquer motivo, seu tratamento e acompanhamento no INI/Fiocruz serão os mesmos necessários para todos os pacientes.

A sua participação com relação ao Projeto consiste em autorizar que:

- 1) alguns exames sejam feitos para o diagnóstico e acompanhamento da sua doença;
- 2) parte do material coletado para estes exames ou seus resultados seja usada neste estudo;
- 3) sejam feitas fotografias ou filmagem de suas feridas na pele, nariz, boca ou garganta, para estudo;
- 4) parte do material coletado seja guardado a fim de servir para outros estudos. Estes outros estudos terão que ser analisados e autorizados por um Comitê de Ética em Pesquisa. Em caso de pesquisas futuras com o seu material armazenado, você será contactado para dar o consentimento de novo, por meio de um outro termo de consentimento referente ao novo projeto de pesquisa.

Os exames e tratamentos aplicados lhe serão gratuitos. Você receberá todos os cuidados médicos adequados para a sua doença.

Participando deste estudo você terá algumas responsabilidades: seguir as instruções do seu médico; comparecer à unidade de saúde nas datas marcadas; e relatar a seu médico as reações que você apresentar durante o tratamento, tanto positivas quanto negativas.

Caso você necessite de atendimento médico enquanto estiver participando do estudo, procure o Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) - Fiocruz, mesmo fora do dia da sua consulta agendada. Em caso de necessidade ou caso tenha alguma dúvida ou algum relato a fazer, ligue a qualquer dia nos telefones (21) 3865-9670; (21) 3865-9609; (21) 3865-9541 para a Dra Cláudia Maria Valete Rosalino, Dra. Maria Inês Fernandes Pimentel, Dr. Marcelo Rosandiski Lyra, Dr. Mauricio Naoto Saheki ou Dr. Armando de Oliveira Schubach. Caso você precise de internação no

Versão Abril de 2019

Rubrica do médico: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante ou responsável: \_\_\_\_\_

hospital por causa de sua doença ou de sua participação no estudo, a equipe médica providenciará seu leito no INI - Fiocruz.

Seu nome e dados pessoais serão mantidos em segredo (confidenciais). Os profissionais do INI/Fiocruz que lidam com os seus dados e resultados dos seus exames (médicos, profissionais do laboratório, etc) utilizam senhas pessoais para acesso aos dados e prontuários e assinam um termo com o compromisso de confidencialidade. Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas científicas, inclusive relatos de caso, sem revelar quem você é. Suas imagens poderão ser divulgadas nestas publicações científicas desde que nelas você não possa ser reconhecido. Entretanto, se necessário, os seus registros médicos estarão disponíveis para consulta para a equipe envolvida no estudo, para o Comitê de Ética em Pesquisa, para as Autoridades Sanitárias e para você.

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo, assim como a qualquer momento durante seu acompanhamento. O seu médico deverá oferecer todas as informações sobre sua saúde, seus direitos, e riscos e benefícios relacionados à sua participação neste estudo.

**Procedimentos, exames e testes que serão utilizados:**

Antes do tratamento haverá:

- ✓ coleta de informações sobre a doença;
- ✓ exame médico geral e exame da pele com descrição e fotografia ou filmagem das lesões;
- ✓ exame interno do nariz, boca e garganta com um aparelho chamado fibra ótica, que permite ver lesões pequenas ou em locais difíceis. Serão feitas descrição e fotografia ou filmagem das lesões (se necessário será aplicado "spray" de anestésico local);
- ✓ retirada, com anestesia local, de um pequeno pedaço (biópsia) de "íngua", de feridas ou área sadia de pele ou de nariz, boca ou garganta, para realização de exames tanto para diagnóstico quanto para pesquisa. Os exames são: culturas e outros métodos de identificação de possíveis agentes de doença como fungos, bactérias e leishmânias; identificação de células e outros componentes da resposta de defesa do corpo aos agentes de doença e ao tratamento, nestes pequenos pedaços retirados.
- ✓ Outros materiais também poderão ser coletados: aspiração com seringa e agulha ou raspagem com lâmina de bisturi da borda da lesão e de secreções em lesões de pele que não sejam feridas abertas.

Outros exames também serão realizados para diagnosticar outras doenças que podem ser confundidas com a LTA, para avaliar se a doença é grave e também os efeitos dos medicamentos durante o tratamento: um ou dois testes cutâneos (uma injeção na pele da região anterior do antebraço, e reavaliação 2 a 3 dias após a injeção); exames de sangue (quantidade de mais ou menos cinco colheres de sopa),

Versão Abril de 2019

Rubrica do médico: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante ou responsável: \_\_\_\_\_



exame de saliva (coletada com um tipo de cotonete), radiografia dos pulmões e da face (se necessário também tomografia computadorizada); e eletrocardiograma.

Os exames de sangue, exame dos pedacinhos de pele ou do nariz, boca ou garganta e outros exames como eletrocardiograma permitem avaliar o diagnóstico, seu estado geral e efeitos do tratamento. Também permitem realização de estudo da resposta inflamatória e imunológica da doença, ou seja, como seu corpo responde e se defende da presença do agente – fungo, bactéria ou leishmânia.

Outros exames poderão ser feitos, caso haja necessidade: exames da audição e do equilíbrio; exames fonoaudiológicos para testar movimentação da boca ao falar e engolir; acompanhamento fonoaudiológico; exame da boca e dos dentes; avaliação nutricional e dietética.

### **Tratamento e acompanhamento:**

O tratamento da LTA costuma ser com o medicamento glucantime por via intramuscular (“no músculo”, IM) ou intravenosa (“na veia”, IV), geralmente uma injeção ao dia durante 20 a 30 dias, contínuos ou com intervalos de descanso. Para alguns pacientes poderá ser utilizada a via intralésional (IL), em que o remédio é colocado dentro da pele, ao redor e debaixo da ferida. O tempo do tratamento poderá ser diminuído ou aumentado conforme a necessidade. Outros remédios que podem ser usados são: a anfotericina B (IV), a pentamidina (IV), e a miltefosina (pela boca, via oral). Todos os remédios necessitam de medidas de acompanhamento parecidas.

Após o início do tratamento, você deverá comparecer a aproximadamente três consultas: dentro de 7 a 10 dias; 14 a 21 dias; e 28 a 35 dias. Caso as feridas não cicatrizem totalmente, o tratamento poderá ser continuado pelo período de tempo necessário. Quando as feridas cicatrizarem ou desaparecerem, você deverá retornar para consulta de reavaliação em 1, 3, 6, 9 e 12 meses após o término do tratamento. E, a partir de então, pelo menos uma vez por ano durante um prazo indefinido (no mínimo 5 anos).

A cada retorno deverão ser realizados avaliação médica e exames de sangue (na quantidade aproximada de uma a cinco colheres de sopa) para avaliar os efeitos dos medicamentos utilizados no seu tratamento e/ou para avaliar a evolução da doença. Outros exames, como o eletrocardiograma durante o tratamento, poderão ser realizados quando indicados pelo médico.

Se você quiser, poderá saber os resultados dos exames, bastando perguntar ao seu médico.

### **Inconvenientes e riscos principais:**

A coleta de sangue poderá causar alguma dor e, eventualmente, poderá haver a formação de uma área arroxeadada no local, que voltará ao normal dentro de alguns dias.

Ocasionalmente, os testes na pele poderão apresentar uma reação com inflamação do local, formação de bolhas e, mais raramente, formação de ferida. Isso melhora dentro de alguns dias a poucas semanas.

Versão Abril de 2019

Rubrica do médico: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante ou responsável: \_\_\_\_\_

Tanto os testes na pele quanto o anestésico injetado no momento da biópsia (retirada de um pequeno pedaço de pele para exame) poderão causar alergia com aparecimento de áreas vermelhas, empoladas e com coceira na pele, e que respondem bem a medicamentos anti-alérgicos. Mais raramente poderá haver uma reação mais grave com dificuldade de respirar e necessidade de cuidados mais intensos, existentes no INI -Fiocruz.

No local da biópsia poderá ocorrer inflamação e dor, acompanhados ou não de infecção por bactérias. Caso isso ocorra, poderá ser necessário o uso de medicamentos para dor e antibióticos.

Os medicamentos glucantime, anfotericina B, pentamidina, e miltefosina costumam causar alguns efeitos indesejáveis. Glucantime, pentamidina e miltefosina não devem ser utilizados na gravidez, e seu uso em mulheres que podem ter filhos deve ser acompanhado de uso de método anticoncepcional eficaz, como preservativo de látex masculino ou feminino ("camisinha"), diafragma feminino, ou anticoncepcional oral ("pílula"). No caso da miltefosina, recomenda-se evitar a gravidez por 3 meses após o tratamento. Quando o tratamento da LTA não puder ser adiado no caso da mulher estar grávida, a anfotericina B poderá ser utilizada. Os exames com raios-x também não devem ser realizados em grávidas.

Para garantir que seus dados são confidenciais, somente os pesquisadores com senhas pessoais no INI - Fiocruz têm acesso aos seus dados (resultados de exames, fotografias, etc), e eles assinam documentos em que se comprometem a manter a confidencialidade dos dados dos participantes dos estudos.

#### **Formas de ressarcimento:**

Se for necessário, nos dias de seu atendimento, poderá ser fornecida alimentação conforme rotina do Serviço de Nutrição e Serviço Social do INI para pacientes externos.

Se você se sentir prejudicado pela participação no estudo, poderá receber indenização.

#### **Benefícios esperados:**

Espera-se que, ao final do tratamento, você esteja curado da LTA, embora as consultas de retorno por alguns anos após o tratamento sejam necessárias para a confirmação da cura. Os resultados deste estudo poderão ou não beneficiá-lo diretamente, e, no futuro, poderão beneficiar outras pessoas. Espera-se que este estudo ajude para que o diagnóstico e acompanhamento do tratamento de pacientes com LTA possa ser feito de forma mais eficaz e segura.

Caso a sua investigação demonstre outro diagnóstico diferente de LTA, você será devidamente orientado quanto ao tratamento mais adequado para o seu caso. Este tratamento poderá ser feito no INI ou em outra instituição pública, na dependência de cada caso.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INI também poderá ser contatado: (21)3865-9585 ou pelo e-mail: [cep@ini.fiocruz.br](mailto:cep@ini.fiocruz.br). O CEP é um comitê que analisa e

Versão Abril de 2019

Rubrica do médico: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante ou responsável: \_\_\_\_\_

aprova os estudos científicos para garantir que eles sejam feitos de acordo com as normas brasileiras de proteção aos participantes de pesquisa e que os direitos dos participantes sejam respeitados.

Este termo de consentimento foi redigido em duas vias iguais, uma para o participante e outra para o pesquisador, que será arquivada no seu prontuário médico.

Declaro que li e entendi todas as informações referentes a este estudo, e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe médica, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas.

Recebi uma via deste termo de consentimento e pelo presente consinto, voluntariamente, em participar deste estudo de pesquisa.

\_\_\_\_\_  
Nome paciente: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome médico: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome testemunha<sup>2</sup>: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome testemunha<sup>2</sup>: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
<sup>2</sup> Apenas no caso de participantes impossibilitados de manifestar o seu consentimento por escrito. No caso de menores de 18 anos, deverá ser assinado pelo pai, mãe ou responsável legal.

Versão Abril de 2019

Rubrica do médico: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante ou responsável: \_\_\_\_\_

## ANEXO II - PARECER DO CONSUBSTANCIADO

INSTITUTO NACIONAL DE  
INFECTOLOGIA EVANDRO  
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Quantificação da carga parasitária em amostras coletadas de borda interna e externa de lesões cutâneas ulceradas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana

**Pesquisador:** MAURO CELIO DE ALMEIDA MARZOCHI

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 96556718.9.0000.5262

**Instituição Proponente:** INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

**Patrocinador Principal:** Fundação Oswaldo Cruz

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.889.656

**Apresentação do Projeto:**

Introdução: As leishmanioses constituem um grupo de doenças infecciosas que representam um problema de saúde pública no mundo, ocupando lugar entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância. São causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que são transmitidos através de insetos vetores do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae), conhecidos como flebotomíneos. O ciclo biológico compreende formas promastigotas e paramastigotas, flageladas que se desenvolvem no trato alimentar dos flebotomíneos e formas amastigotas, sem flagelo livre, que parasitam células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado, multiplicando-se por divisão binária em ambos hospedeiros. Nas Américas, as diferentes apresentações clínicas das formas tegumentares são genericamente denominadas de leishmaniose tegumentar americana (LTA), para distingui-las das formas dermatrópicas encontradas no Velho Mundo. No Brasil, a LTA é registrada em todos os estados da federação, associada a sete espécies de *Leishmania*, sendo *Leishmania (V.) braziliensis* a espécie mais prevalente. No Brasil, a LTA é uma doença em expansão geográfica, com registro de casos e de vetores em todo território nacional e suas manifestações clínicas apresentam amplo espectro, que pode ser um reflexo da complexa interação entre a resposta imunológica do paciente e as características genéticas das espécies envolvidas na infecção. A úlcera típica da leishmaniose cutânea é, na maioria das vezes, única, arredondada, indolor, medindo até alguns centímetros, base infiltrada e endurecida, bordas

**Endereço:** Avenida Brasil 4365

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.040-360

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3865-9585

**E-mail:** cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE  
INFECTOLOGIA EVANDRO  
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 2.889.656

bem delimitadas, elevadas e eritematosas, fundo granuloso e avermelhado. Na LTA, os padrões clínicos e epidemiológicos são diversos, por essa razão, o diagnóstico nem sempre é uma tarefa fácil, devendo sempre que possível, estar apoiado nos exames laboratoriais, aspectos clínicos e evidências epidemiológicas. Uma importante ferramenta para o diagnóstico laboratorial, o teste intradérmico de Montenegro (IDRM), teve sua produção industrial descontinuada e neste contexto, o exame direto se torna a primeira opção para o diagnóstico. É um diagnóstico de certeza, porém a leitura das lâminas é demorada e exaustiva, principalmente em áreas endêmicas para *Leishmania braziliensis*, infecção que cursa com baixa carga parasitária na lesão. O exame direto realizado através do procedimento de escarificação, constitui um dos métodos mais simples e mais antigo a ser utilizado no diagnóstico da leishmaniose e permanece ainda como o método mais acessível para o diagnóstico definitivo da leishmaniose. Consiste em buscar o parasito em material obtido de raspados das lesões, sem a necessidade de anestesia local. Por outro lado a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem alcançando cada vez mais aplicabilidade no campo do diagnóstico das leishmanioses. Uma das principais vantagens do uso da PCR é a possibilidade de detecção de DNA do parasito mesmo quando há baixa carga parasitária, superando nesse sentido os métodos tradicionais. Métodos baseados na PCR são também utilizados para caracterização de parasitos e estimativa de carga parasitária alcançando uma enorme aplicabilidade em estudos epidemiológicos, monitoramento de tratamentos e ensaios de eficácia de medicamentos. Para a avaliação da carga parasitária utiliza-se a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) que permite o monitoramento da amplificação empregando marcadores fluorescentes. Tal metodologia permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizados em uma única etapa tornando a técnica extremamente rápida, menos trabalhosa, já que dispensa a necessidade de eletroforese em gel, altamente produtiva pois permite o processamento de várias amostras de uma só vez e com menor risco de contaminação tendo em vista que os tubos permanecem fechados durante todo o processo. Adicionalmente, a utilização do marcador fluorescente SYBR Green no lugar de sondas específicas diminui o custo da técnica tornando-a mais acessível. Esta tecnologia está se tornando disponível em vários países e é recomendável que seja desenvolvida em laboratórios centrais em países endêmicos para leishmanioses. Diversos alvos têm sido utilizados para quantificação de espécies de *Leishmania* por SYBR Green, sendo os mais comuns baseados no KDNA com alvo gênero específico e outros sub-gênero específicos. Entretanto esses alvos têm como inconveniente para quantificação, o fato de que o número de cópias do KDNA diferem entre as espécies de *Leishmania*, cepas e estágios de crescimento. Outros alvos tem sido avaliados a fim de contornar essa dificuldade como subunidade menor do RNA

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE  
INFECTOLOGIA EVANDRO  
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 2.889.656

Ribossomal, DNA polimerase, Glicose-6-fosfato desidrogenase. As técnicas histopatológicas apesar de apresentarem baixa sensibilidade, são importantes no diagnóstico diferencial e permitem estudar o infiltrado inflamatório produzido durante a infecção por parasitos do gênero *Leishmania*. As lesões histopatológicas na LTA podem ser visualizadas em cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina e são caracterizadas por uma reação inflamatória crônica, às vezes granulomatosa, com a presença de linfócitos, plasmócitos e macrófagos com áreas necróticas focais. Formas amastigotas podem ser encontrados no citoplasma de macrófagos como organismos arredondados, com um núcleo circular, um cinetoplasto em forma de bastão e cercado por um halo claro. A histopatologia das lesões cutâneas de LTA pode variar conforme o tempo da doença. Lesões agudas geralmente contêm densos infiltrados difusos de linfócitos, plasmócitos e histiócitos com numerosos pontos cinza-azulados de *Leishmania* no citoplasma por toda a derme reticular. O diagnóstico característico de lesão crônica é diferente, apresentando granulomas tuberculóides com muito poucos organismos na metade superior da derme, muitas vezes colidindo com a epiderme. A sensibilidade das técnicas depende de vários fatores como a dispersão dos parasitos na lesão, o método de coleta, o tempo de evolução e a habilidade técnica do pessoal. Segundo as recomendações da Organização Mundial de Saúde, o local de eleição para coleta de material para diagnóstico da LTA é a borda ativa da lesão. No entanto, alguns estudos têm relatado uma maior carga parasitária na parte interna da lesão em relação à borda. Ramirez et al. (2000) observaram através do exame direto que em amostras coletadas do centro da lesão foi possível visualizar amastigotas mais definidas e maiores que puderam ser mais facilmente identificadas do que as da borda. Além disso, foi possível visualizar pela PCR convencional uma banda mais forte em amostras obtidas do centro da lesão. Adams et al. (2014), avaliaram por qPCR a carga parasitária de amostras obtidas a partir de swabs no centro da lesão e aspirados realizados na borda externa com auxílio de uma agulha, tendo este último método de coleta apresentando menor quantificação parasitária. Finalmente, Suarez et al. (2015), avaliaram a diferença de carga parasitária na borda externa, borda interna e centro da lesão e encontraram maior carga parasitária na borda interna e centro da lesão. Hipótese: A dispersão dos parasitos na lesão de LTA através da avaliação da carga parasitária tem sido discutida e os resultados dessas avaliações podem impactar diretamente na rotina de coleta de amostras clínicas para o diagnóstico. Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo, Mello et al. (2011) avaliaram 110 pacientes que apresentavam lesão cutânea ulcerada através do procedimento de escarificação realizado na borda interna e externa da lesão. Quarenta pacientes foram considerados positivos através do isolamento em cultura. Os resultados de sensibilidade para escarificação foram 62,5% na borda interna e

Endereço: Avenida Brasil 4365  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3865-9585 E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE  
INFECTOLOGIA EVANDRO  
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 2.889.656

42,5% para o procedimento realizado na borda externa da lesão. As lâminas de escarificação preparadas com material coletado a partir da borda interna da lesão, de maneira geral, apresentaram maior quantidade de células brancas e menos hemácias permitindo uma melhor visualização do campo microscópico. Vale ressaltar, que neste estudo, não foi observada diferença estatística entre sensibilidade e tempo de evolução. Adicionalmente, será realizado um estudo descritivo para conhecer a dispersão celular na borda interna e externa da lesão cutânea ulcerada, a análise histopatológica será importante para entender melhor a distribuição dos parasitos na lesão. Alguns pontos devem ser esclarecidos tais como: maior sensibilidade no exame direto na borda interna da lesão poderá ter sido devido a melhor qualidade das preparações ou a maior quantidade de parasitos neste sítio como tem sido apontada por alguns autores? Há diferença entre a carga parasitária e o tempo de evolução? Qual o perfil celular nos diferentes sítios da lesão? A avaliação da carga parasitária em dois sítios da lesão através da qPCR dessas amostras poderá auxiliar diretamente na rotina diagnóstica, podendo contribuir para o aumento da sensibilidade dos exames laboratoriais.

**Metodologia Proposta. Extração DNA** Para extração do DNA inicialmente cada lâmina será limpa suavemente com lenço de papel e com auxílio de um bisturi e uma placa de petri estéreis o material será retirado da lâmina e acondicionado em um tubo eppendorf com a devida identificação. Cada lâmina possui 12 áreas demarcadas onde foram depositados o material coletado, toda a extensão da lâmina será raspada. Posteriormente a extração será realizada utilizando o Kit ChargeSwitch™ Forensic DNA Purification Kit – Thermo Fisher Scientific segundo recomendações do fabricante. O DNA isolado será quantificado por fluorimetria utilizando o Qubit Fluorímetro®-qPCR A qPCR será realizada segundo protocolo descrito por Pereira et al., (2017). A quantificação absoluta utilizará iniciadores descritos por Prina et al. (2007) [5'TGGGGCGTCAGAG3' e 5'GGGTGTCATCGTTTGC3'], direcionados ao gene da subunidade menor do RNA do gênero *Leishmania*. A quantificação do gene de beta-actina humana [5'TAATGTCACGCACGATTTCCC3' e 5'TCACCGAGCGCGGCT3'] (RODRIGUES et al, 2011) também será realizada. As reações serão realizadas em triplicata utilizando o termociclador "StepOne® Real-Time PCR System" (Applied Biosystems) com Power SYBR-Green PCR Master Mix e iniciadores a uma concentração de 500 nM em um programa incluindo pré-incubação a 95 oC por 10 minutos, 40 ciclos de 95 oC por 30 segundos e 60 oC por 1 minuto. Após a amplificação uma curva de melting será gerada, iniciando em 65oC com contínuo aquecimento a 0,1oC/s até 95 oC, a fim de verificar a especificidade do amplicon. A cada corrida serão realizadas duas curvas padrão. A curva será construída com 5 concentrações conhecidas de DNA de cepa referência de *L. (V.) braziliensis* e será utilizada em triplicata como controle para determinação das concentrações

Endereço: Avenida Brasil 4365  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3865-9585 E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE  
INFECTOLOGIA EVANDRO  
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 2.889.656

das amostras desconhecidas. Será realizada também uma curva com 5 diluições seriadas a partir de 30 mg de tecido fresco de doador saudável, utilizada em triplicata, para corrigir as variações na quantidade de DNA e a possível presença de inibidores na amostra clínica. A carga parasitária será definida como número equivalentes de parasitos por grama de tecido. Controles negativos serão adicionados a cada reação realizada. Só serão quantificadas amostras cujos ciclos de quantificação (Cq) estiverem dentro da faixa de variação da curva padrão. O software integrado ao sistema Step one® armazena as informações coletadas durante o processo de amplificação, particularmente a intensidade da fluorescência dos corantes e os ciclos realizados, permitindo a análise computadorizada dos resultados.-Análise Histopatológica. Será realizado um estudo descritivo das lâminas do exame histopatológico coradas pela hematoxilina-eosina a fim de identificar os principais tipos celulares presentes na borda interna e externa da lesão. A leitura será realizada em microscópio óptico com aumento de 400X. Metodologia de Análise de Dados. A análise exploratória dos dados será realizada através de freqüências e proporções no caso de variáveis categóricas e mediana e intervalo interquartilico ou média e desvio padrão para variáveis contínuas. Para avaliar se há diferença significativa entre a carga parasitária na borda interna e externa da lesão será realizado o teste de Wilcoxon. Será avaliado também a significância estatística entre carga parasitária e tempo de evolução da lesão, e entre carga parasitária através do teste Mann-Whitney. P-valores < 0.05 indicarão associação estatisticamente significativa. As análises estatísticas serão realizadas com o software SPSS® for Windows versão 11. Desfecho Primário: Determinar a carga parasitária em dois locais da lesão e avaliar se há diferença estatisticamente significante.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário: Quantificar a carga parasitária em amostras coletadas da borda interna e externa de lesões ulceradas de LTA utilizando a técnica de PCR quantitativa. Objetivo Secundário: Avaliar os tipos celulares presentes na borda interna e externa da lesão através da análise histopatológica.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: Todas as amostras já foram coletadas e o projeto aqui apresentado não irá impactar em novas condutas clínicas. As lâminas estão armazenadas no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em leishmanioses e fazem parte de um biorrepositório. Desta forma não há riscos envolvidos na realização desse estudo. Benefícios: Com os resultados desse estudo espera-se conhecer a carga parasitária em dois diferentes sítios da lesão e conhecer a distribuição celular na lesão de LTA. Os resultados desse estudo poderão gerar um ganho potencial na capacidade de

Endereço: Avenida Brasil 4365  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3865-9585 E-mail: cep@ini.fiocruz.br



INSTITUTO NACIONAL DE  
INFECTOLOGIA EVANDRO  
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 2.889.656

deteção de Leishmania no diagnóstico laboratorial e contribuir com novas diretrizes para a rotina diagnóstica da LTA em todo o país.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Desenho: Estudo transversal para avaliação da carga parasitária em amostras obtidas por escarificação a partir da borda interna e externa de lesão ulcerada de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). A população do estudo é uma amostra de conveniência constituída por 40 pacientes, positivos para LTA através do isolamento em cultura que foram atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses – INI/FIOCRUZ no período de 2010-2012. Para cada paciente foi preparada através do procedimento de escarificação uma lâmina com material de borda interna e uma lâmina de borda externa da lesão que se encontram arquivadas. Segundo o pesquisador principal, o protocolo não prevê uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc) e não haverá retenção de amostras para armazenamento em banco. O estudo não é multicêntrico no Brasil.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O protocolo de estudo propõe dispensa do TCLE, sob a justificativa de que "no período em que as amostras foram coletadas todos os pacientes concordaram em participar do estudo "Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz" (CAAE 0033.0.009.000-09) através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O TCLE previa autorização para armazenamento de amostras. Este estudo está sendo submetido a aprovação do CEP e solicitamos a dispensa de novo termo de consentimento devido à dificuldade de localização dos pacientes que não se encontram mais em acompanhamento no INI.". Foi apresentado (postado na PB), pedido de Autorização para Dispensa de Aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado pelo pesquisador principal.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências ou inadequações.

Por entendermos que o protocolo obedece às normas de condução de pesquisas em seres humanos regulamentadas pelo CNS/MS, indicamos sua aprovação com a previsão de produção de relatórios semestrais (parciais ou final), de acordo com a Res. CNS no. 466/12.

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manginhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE  
INFECTOLOGIA EVANDRO  
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 2.889.656

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1192255.pdf	23/08/2018 11:04:39		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DispensaTCLEassinado.pdf	23/08/2018 11:04:14	CINTIA XAVIER DE MELLO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Seminariol_CaioThomaz_Versaofinal.doc	15/08/2018 03:29:48	CINTIA XAVIER DE MELLO	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoPlatBR.pdf	15/08/2018 03:24:08	CINTIA XAVIER DE MELLO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 12 de Setembro de 2018

---

**Assinado por:**  
**Léa Ferreira Camillo Coura**  
**(Coordenador)**

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

## APÊNDICES

**Apêndice A:** Resultados de carga parasitária pela qPCR, número de caselas positivas no exame direto, tempo de evolução de lesão e desfecho clínico em amostras de escarificação de borda interna, escarificação de borda externa e *imprint* de 39 pacientes diagnosticados com LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).

Código paciente	Borda Interna		Borda Externa		<i>Imprint</i>		Tempo de evolução da lesão	Tratamento	Desfecho Clínico
	Carga parasitária <sup>a</sup>	Nº caselas positivas	Carga parasitária <sup>a</sup>	Nº caselas positivas	Carga parasitária <sup>a</sup>	Nº caselas positivas			
<b>1</b>	3,60E+05	12	1,32E+05	12	2,03E+01	12	1 a 3 meses	Glucantime	Reativação
<b>2</b>	5,20E+02	EDN	1,00E+02	EDN	5,56E+04	EDN	1 mês	Glucantime	Cicatrização total
<b>3</b>	4,97E+04	EDN	3,53E+02	EDN	2,02E+02	EDN	1 a 3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>4</b>	7,44E+05	11	1,44E+04	1	1,09E+05	8	1 a 3 meses	Glucantime	Reativação
<b>5</b>	1,48E+05	12	1,81E+05	8	6,40E+02	3	1 a 3 meses	Glucantime	Reativação
<b>6</b>	2,11E+02	EDN	3,56E+01	EDN	8,09E+01	EDN	>3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>7</b>	2,99E+03	3	1,37E+04	EDN	2,66E+03	2	1 a 3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>8</b>	1,68E+03	EDN	9,36E+04	EDN	1,95E+02	EDN	1 a 3 meses	Glucantime	Cicatrização total

<b>9</b>	1,19E+03	EDN	1,67E+03	EDN	2,40E+02	EDN	1 a 3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>10</b>	9,14E+05	11	2,56E+04	1	3,63E+05	12	1 a 3 meses	Glucantime	Lesão em involução
<b>11</b>	2,11E+05	12	9,93E+04	8	7,01E+03	1	1 a 3 meses	Glugantime	Cicatrização total
<b>12</b>	1,92E+02	EDN	1,11E+02	EDN	1,09E+03	2	1 a 3 meses	Glucantime	Reativação
<b>13</b>	1,22E+06	12	1,05E+04	1	2,48E+05	5	>3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>14</b>	1,24E+03	EDN	1,15E+03	EDN	6,00E+02	1	>3 meses	Glugantime	Cicatrização total
<b>15</b>	7,97E+03	EDN	3,57E+02	EDN	1,54E+04	9	1 a 3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>16</b>	3,93E+04	1	1,59E+02	EDN	1,21E+04	1	>3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>17</b>	5,73E+05	12	6,63E+04	4	1,46E+05	4	1 mês	Glucantime	----
<b>18</b>	5,77E+06	10	4,41E+06	10	3,87E+05	3	>3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>19</b>	2,77E+06	12	3,65E+05	8	7,89E+05	11	1 a 3 meses	Glucantime	Reativação

<b>20</b>	2,03E+06	6	8,61E+03	EDN	4,19E+05	10	1 a 3 meses	Glucantime	----
<b>21</b>	4,91E+04	4	7,54E+04	9	7,97E+04	12	1 a 3 meses	Glucantime	----
<b>22</b>	3,77E+03	1	8,26E+04	8	3,08E+03	EDN	>3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>23</b>	5,73E+04	12	3,87E+04	11	5,45E+03	EDN	>3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>24</b>	3,42E+06	12	6,39E+03	EDN	1,48E+05	8	1 a 3 meses	Glucantime	Reativação
<b>25</b>	3,06E+05	1	6,46E+04	1	2,23E+05	7	1 a 3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>26</b>	1,30E+02	EDN	8,91E+01	EDN	4,62E+01	EDN	>3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>27</b>	1,20E+03	EDN	4,47E+03	EDN	3,85E+01	EDN	>3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>28</b>	2,64E+05	4	2,70E+05	6	5,58E+04	6	1 a 3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>29</b>	1,02E+05	1	2,57E+03	EDN	8,15E+04	3	1 mês	Glucantime	Cicatrização total
<b>30</b>	1,74E+00	EDN	5,93E+02	EDN	9,47E+02	1	1 a 3 meses	Glucantime	Cicatrização total

<b>31</b>	4,61E+03	EDN	9,47E+02	EDN	1,12E+02	EDN	>3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>32</b>	1,13E+06	11	2,10E+05	6	3,49E+05	7	>3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>33</b>	1,38E+02	EDN	2,74E+03	EDN	4,61E+01	EDN	>3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>34</b>	4,95E+02	EDN	6,98E+01	EDN	5,35E+03	2	Um mês	Glucantime	Cicatrização total
<b>35</b>	1,84E+02	EDN	1,55E+02	EDN	5,30E+03	1	Um mês	Glucantime	Cicatrização total
<b>36</b>	4,62E+03	EDN	6,80E+03	EDN	3,73E+03	EDN	1 a 3 meses	Glucantime	Cicatrização total
<b>37</b>	4,69E+04	8	4,29E+04	9	1,60E+04	9	1 a 3 meses	Glugantime	Cicatrização total
<b>38</b>	1,43E+05	12	1,63E+04	2	5,93E+03	1	>3 meses	Glucantime	Reativação
<b>39</b>	2,12E+05	9	3,51E+03	EDN	2,49E+05	8	1 a 3 meses	Glucantime	Reativação

**Legenda: EDN:** Exame direto negativo.

**Apêndice B:** Avaliação histopatológica semi-quantitativa das formas amastigotas encontradas em borda interna e externa de cortes histológicos de lesão cutânea ulcerada de 19 pacientes diagnosticados com LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).

Código Paciente	CARGA PARASITÁRIA					
	Borda Interna			Borda Externa		
	Índice Parasitário	Amastigota por campo	Amastigota dentro de vacúolo	Índice Parasitário	Amastigota por campo	Amastigota dentro de vacúolo
1	1+	1	0	0	0	0
2	4+	53	7	3+	28	5
3	1+	3	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	3+	49	6	0	0	0
6	3+	18	2	1+	1	1
7	4+	66	7	0	0	0
8	2+	4	1	1+	1	1
9	1+	2	1	1+	2	1
10	4+	136	14	0	0	0
11	3	14	2	1+	1	1
12	3+	15	4	3+	11	2
13	3+	21	4	2+	6	2
14	0	0	0	0	0	0
15	3+	50	5	0	0	0
16	0	0	0	1+	2	1
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	3+	15	1	1+	1	1

**Apêndice C:** Avaliação histopatológica das alterações gerais encontradas em borda interna e externa de cortes histológicos de lesão cutânea ulcerada de 19 pacientes diagnosticados com LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).

<b>Cód Paciente</b>	<b>Úlcera bem caracterizada</b>	<b>HEPE</b>	<b>Tecido de granulação</b>	<b>Necrose</b>	<b>HIPERPLASIA ESCAMOSA</b>
1	Não	Não	Sim	Sim	2+
2	Não	Sim	Não	Não	3+
3	Sim	Não	Sim	Sim	1+
4	Sim	Sim	Sim	Sim	3+
5	Sim	Não	Sim	Não	1+
6	Sim	Sim	Sim	Não	3+
7	Sim	Sim	Sim	Não	3+
8	Sim	Sim	Sim	Não	3+
9	Sim	Sim	Sim	Não	3+
10	Sim	Não	Sim	Não	2+
11	Sim	Sim	Sim	Não	3+
12	Não	Sim	Não	Não	3+
13	Sim	Não	Sim	Sim	0+ (Sem epiderme)
14	Sim	Sim	Sim	Não	3+
15	Sim	Não	Sim	Sim	0+ (Sem epiderme)
16	Sim	Não	Sim	Sim	1+
17	Sim	Não	Sim	Sim	0+
18	Sim	Não	Sim	Sim	0+
19	Sim	Não	Sim	Não	0+



**Apêndice D:** Avaliação histopatológica de granulomas em borda interna e externa de cortes histológicos de lesão cutânea ulcerada de 19 pacientes diagnosticados com LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).

Cód Paciente	GRANULOMA Borda Interna		GRANULOMA Borda Externa	
	Bem formado	Mal formado	Bem formado	Mal formado
1	Não	Sim	Não	Sim
2	Não	Sim	Não	Sim
3	Não	Sim	Não	Sim
4	Não	Sim	Não	Sim
5	Não	Não	Não	Não
6	Sim	Sim	Não	Sim
7	Não	Sim	Não	Sim
8	Não	Sim	Não	Sim
9	Não	Sim	Não	Sim
10	Não	Sim	Não	Sim
11	Não	Sim	Não	Sim
12	Não	Sim	Não	Sim
13	Não	Sim	Não	Sim
14	Sim	Sim	Não	Sim
15	Não	Sim	Não	Sim
16	Não	Sim	Não	Sim
17	Não	Sim	Não	Sim
18	Sim	Sim	Sim	Sim
19	Não	Sim	Não	Sim



**Apêndice F:** Avaliação histopatológica semi quantitativa de plasmócitos, linfócitos e neutrófilos em borda interna e externa de cortes histológicos de lesão cutânea ulcerada de 19 pacientes diagnosticados com LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).

Cód do Paciente	Borda Interna			Borda Externa		
	Plasmócitos	Linfócitos	Neutrófilos	Plasmócitos	Linfócitos	Neutrófilos
1	2+	1+	1+	1+	1+	1+
2	3+	2+	1+	3+	2+	1+
3	2+	2+	0	2+	1+	0
4	3+	2+	2+	2+	2+	0
5	3+	1+	1+	2+	1+	1+
6	3+	3+	1+	2+	2+	0
7	3+	1+	1+	3+	2+	0
8	2+	2+	1+	3+	2+	2+
9	3+	3+	0	2+	2+	0
10	3+	3+	1+	3+	3+	1+
11	3+	3+	1+	3+	3+	0
12	3+	2+	0	3+	2+	0
13	2+	3+	2+	2+	3+	1+
14	2+	2+	1+	1+	1+	0
15	3+	3+	0	3+	3+	1+
16	3+	3+	1+	1+	1+	1+
17	3+	2+	0	3+	2+	0
18	3+	2+	1+	2+	1+	0
19	2+	2+	---	1+	2+	---

**Apêndice G:** Avaliação das alterações histopatológicas específicas em borda interna e externa de cortes histológicos de lesão cutânea ulcerada de 19 pacientes com diagnosticados com LC, atendidos no Rio de Janeiro, Brasil (2009-2010).

Cód do Paciente	Alterações Histopatológicas específicas											
	Borda Interna						Borda Externa					
	REC	REN	RENG	REG	RET	RES	REC	REN	RENG	REG	RET	RES
1	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
2	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
3	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
4	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
5	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
6	Não	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
7	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
8	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
9	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
10	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
11	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
12	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
13	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
14	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não
15	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
16	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
17	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não
18	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
19	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não

**Legenda:** **REC:** Reação Exsudativa Celular; **REN:** Reação Exsudativa Necrótica; **RENG:** Reação Exsudativa e Necrótico-Granulomatosa; **REG:** Reação Exsudativa e Granulomatosa; **RET:** Reação Exsudativa e Tuberculoide; **RES:** Reação Exsudativa e Sarcoide.