

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
UNIFAL - MG

**EDUARDO DE FIGUEIREDO PELOSO**

**LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA  
DE PACIENTES DE DIFERENTES REGIÕES DE MINAS GERAIS E  
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GÊNERO *LEISHMANIA***

ALFENAS/MG

2007

**EDUARDO DE FIGUEIREDO PELOSO**

**LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: ANÁLISE  
EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES DE DIFERENTES REGIÕES DE MINAS  
GERAIS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GÊNERO *LEISHMANIA***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL–MG como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Marília Caixeta Franco.  
Co-Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques.

ALFENAS, MG

2007

**EDUARDO DE FIGUEIREDO PELOSO**

**LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: ANÁLISE  
EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES DE DIFERENTES REGIÕES DE  
MINAS GERAIS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GÊNERO  
*LEISHMANIA***

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica.

Aprovada em 16 de outubro de 2007

---

Prof. Dr. Eduardo Sérgio da Silva

Instituição: Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ)

---

Prof. Dr. Paulo Márcio de Faria e Silva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL – MG)

---

Prof<sup>ª</sup>: Dr<sup>ª</sup>. Marília Caixeta Franco

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL – MG)

Aos meus pais e irmãs pelo amor, carinho e confiança em mim depositados, e pelo incentivo constante da busca pelo sucesso, respeito e amor ao próximo.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela constante presença e amor. Por ter me dado o dom da fé e da perseverança.

Aos meus familiares pelo apoio e de modo especial ao meu Tio Vander pelo constante incentivo à docência.

À Profa. Dra Marília Caixeta Franco pela orientação e por ter me estimulado à busca ao conhecimento.

Ao Prof. Dr. Marcos José Marques pela orientação, paciência e transmissão de conhecimentos fundamentais ao desenvolvimento desta dissertação.

Aos amigos especiais Layanne e Thiago que foram fundamentais na execução deste trabalho.

Aos amigos André, Bruno, Pablo, Rudy, Valdomiro e Flávio por terem me proporcionado momentos de “cultura”, alegria e amizade em Alfenas.

Às amigas Daniela, Cristiane e Maurette por terem me dado a verdadeira amizade, carinho e respeito.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos e “agregados” que durante 2 anos foram pacientes e fundamentais para aquisição do conhecimento prático: de modo especial à Angélica, Tiago, Brenda, Rafael, Jacqueline, Luciene, Gustavo, Mariana, Mateus, Nereyda, Fran e Fernanda.

A todos do Laboratório de Microbiologia pela amizade: Rosa, Alan, Eden, Amanda, Marcelo e Martinha.

A todos os meus amigos de Alfenas, do laboratório, da malhação, das baladas, etc.

Ao dermatologista Dr. Cláudio Lellis Figueira de Souza pela valiosa colaboração.

Aos membros da banca examinadora pelas valiosas sugestões nesta dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida por 24 meses.

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), uma das formas clínicas das leishmanioses, está em expansão no Brasil e representa importante causa de morbidade para populações residentes em áreas endêmicas. Avaliações do perfil epidemiológico, dos serviços de diagnóstico e tratamento são necessárias para o estabelecimento de estratégias de controle da doença, assim como o emprego de novas ferramentas laboratoriais, como a PCR. Neste trabalho foram avaliados os aspectos epidemiológicos, de diagnóstico e tratamento de pacientes com LTA de diferentes regiões de Minas Gerais, além do uso de diferentes técnicas de extração de DNA e de iniciadores na PCR para a identificação e diferenciação do agente etiológico. Adicionalmente, foi comparada a positividade dos iniciadores dirigidos para a região conservada (150/152) e variável (13Y/13Z) do minicírculo do kDNA de *Leishmania* em amostras biológicas de pacientes sugestivos para LTA. Foi realizado levantamento epidemiológico, de diagnóstico e tratamento de 824 pacientes portadores de LTA, sendo 261 da região sul e sudoeste do estado de Minas Gerais (SSMG) e 563 do Vale do Rio Doce (VRD). Os dados foram obtidos através das fichas de notificação das Gerências Regionais de Saúde (GRS) do SSMG e do ambulatório de Leishmanioses “Dr. Paulo Araújo Magalhães” de Caratinga (VRD) entre 2002 e 2006. Trinta e nove pacientes com lesões sugestivas para LTA, provenientes destas regiões foram submetidos a exames laboratoriais, além da PCR. As amostras de DNA foram extraídas por aquecimento, pela técnica do fenol/clorofórmio, proteinase K e kit Wizard, e posteriormente usadas na PCR e PCR-RFLP. No período analisado, foi observada diminuição de 59,7% dos casos de LTA no SSMG e de até 25,7% no VRD. A forma clínica cutânea foi a predominante, com 91,9 e 93,6% no SSMG e VRD respectivamente. No SSMG, a maioria dos pacientes (51,7%) tem residência urbana, enquanto que no VRD a rural foi predominante (95,7%). No SSMG houve positividade em 55,6, 10,7 e 19,5% dos casos de LTA no Teste de Montenegro (TM), nos exames parasitológico e histopatológico, respectivamente. No VRD a positividade dos casos de LTA foi de 84,0 no TM e 73,0% no exame parasitológico. A alta por cura com a medicação empregada variou de 71,8 a 92,0% no SSMG e chegou a 78,0% no VRD. Dos 39 pacientes sugestivos, 32 foram confirmados para LTA. As extrações permitiram observar que mesmo a partir de DNA total degradado foi possível detectar kDNA de *Leishmania*. Nas amostras sugestivas, a positividade com 13Y/13Z e 150/152 foi de 56,4 e 76,9% respectivamente. Nos pacientes confirmados para LTA, a positividade com 13Y/13Z foi de 68,7% e com 150/152 foi de 93,7%. O emprego dos iniciadores 150/152 foi mais viável, o que não descarta o uso de 13Y/13Z, dada a expressiva positividade alcançada em amostras que requerem extração simplificada de DNA e com baixo custo. A PCR-RFLP possibilitou a identificação de *L. (V.) braziliensis* nas amostras biológicas dos pacientes com LTA. Os dados do presente trabalho também reforçam a necessidade de ações que estabeleçam um centro de referência no diagnóstico e tratamento da LTA no SSMG.

Palavras-chave: *Leishmania*. Diagnóstico. Tratamento. PCR. Minas Gerais.

## ABSTRACT

The american tegumentary leishmaniasis, (ATL), one of clinic forms of leishmaniasis, is in expansion in Brazil and represent important cause of morbidity for populations who live in endemic areas. Profile epidemiological studies, health services and treatment are needs to establish strategies of disease control, as well as to employ new tools laboratorials, like PCR ones. This research evaluated the epidemiological aspects, diagnoses and treatment from patients with ATL from different regions Minas Gerais, beyond to use varied extraction techniques DNA and different primers in PCR to make possible the identification and differentiation of the etiological agents. Additionally, it compared the positivity of the primers addressed to the conserved (150/152) and variable (13Y/13Z) region of the *Leishmania* kDNA minicircle in biological samples of patients suggestive to ATL. It was to carried out epidemiological studies, diagnoses and treatment of 824 patients with ATL, being 261 from Southern and Southwestern regions of Minas Gerais state (SSMG) and 563 from river Doce valley (VRD). The data were obtained from notification files Regional Health Authorities – RHA of SSMG and from Leishmaniasis ambulatory “Dr. Paulo Araújo Magalhães” at Caratinga city (VRD) between 2002 and 2006. Thirty nine patients from these regions and with suggestive ATL lesions were submitted to laboratorial exams, beyond of the PCR. The DNA samples extracted by heating, phenol/ chloroform technique, proteinase K and by Wizard kit, and later used in the PCR and PCR-RFLP. In the period analyzed, it was observed decrease of 59.7% of ATL cases in SSMG and of up to 25.7% in VRD. The cutaneous clinic form was predominant with 91.9 and 93.6% in SSMG and VRD respectively. The greatest part of the patients from SSMG has urban residence (51.7%) while in VRD the rural was predominant (95.7%). In the SSMG there was positivity in 55.6, 10.7 and 19.5% of ATL cases in the Montenegro test (MT), parasitological and histopatological exams, respectively. In the VRD the positivity was 84.0 in the MT and 73.0% in the parasitological exam. Discharge from the treatment due to cure varied of 71.8 to 92.0% in the SSMG and reached 78.0% in VRD. From the 39 suggestive patients, 32 were confirmed to ATL. The DNA extractions allowed observing that even starting from total degraded DNA was possible to detect kDNA of *Leishmania*. In the suggestive samples, the positivity of DNA with 13Y/13Z and 150/152 was about 56.4 and 76.9% respectively. In the confirmed patients to ATL, the positivity to 13Y/13Z was about 68.7% and to 150/152 was of 93.7%. The employment of the primers 150/152 was viable, what doesn't discard the use of 13Y/13Z, given the expressive positivity reached in samples that request simplified extraction of DNA and with low cost. PCR-RFLP made possible the identification of *L. (V.) braziliensis* in the patients' biological samples with LTA. The data of the present work they also reinforce the need of actions that establish a reference center in the diagnosis and treatment of LTA in SSMG.

Key words: *Leishmania*. Diagnoses. Treatment. PCR. Minas Gerais.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AQP<sub>1</sub>**: Proteína aquagliceroporina 1
- cDNA**: DNA complementar
- dNTPs**: Desoxiribonucleosídeos trifosfatos
- EDTA**: Ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA**: Reação imunoenzimática
- EtBr**: Brometo de etídeo
- fg**: fentogramas
- GRS**: Gerência regional de saúde
- IDRM**: Intradermorreação de Montenegro
- ITS**: espaço interno transcrito
- Kb**: Kilo base
- kDNA**: DNA de cinetoplasto
- LC**: Leishmaniose cutânea
- LT**: Leishmaniose tegumentar
- LTA**: Leishmaniose tegumentar americana
- LV**: Leishmaniose visceral
- MgCl<sub>2</sub>**: Cloreto de magnésio
- NNN**: Meio Neal, Novy e Nicolle
- pb**: Pares de base
- PCR**: Reação em cadeia da polimerase
- pg**: picogramas
- PGPA**: gene PGPA
- RFLP**: Polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição
- RIFI**: Imunofluorescência indireta
- Sb<sup>III</sup>**: Antimônio trivalente
- Sb<sup>V</sup>**: Antimônio pentavalente
- SIL**: Sistema de informações de leishmaniose

**SINAN:** Sistema de informações de agravos e notificação

**SSMG:** Sul e Sudoeste de Minas Gerais

**Taq:** Enzima *Thermus aquaticus*

**TBE:** Tris-Boro-EDTA

**TE:** Tris-EDTA

**TEMED:** N,N,N,N-tetrametilenodiamino

**TM:** Teste de Montenegro

**Tris:** Tri-hidroxi-metil-amino metano

**UV:** ultravioleta

**VRD:** Vale do Rio Doce

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 JUSTIFICATIVA.....	15
3 OBJETIVOS.....	16
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
4.1 Características biológicas do gênero <i>Leishmania</i> .....	17
4.2 Formas clínicas.....	18
4.3 Dados epidemiológicos sobre a leishmaniose tegumentar americana no Brasil.....	19
4.4 Diagnóstico.....	20
4.5 Pesquisa do DNA do parasito.....	22
4.6 Tratamento.....	24
4.7 Critérios de cura.....	26
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
5.1 Levantamento epidemiológico.....	29
5.2 Casuística.....	30
5.3 Coleta de material biológico.....	31
5.4 Análise imunológica.....	32
5.5 Análise parasitológica e histopatológica.....	32
5.5.1 Criopreservação.....	32
5.6 Análise molecular.....	33
5.6.1 Extração.....	33
5.6.2 Análise do material extraído.....	33
5.6.3 PCR.....	34
5.6.4 RFLP.....	34
5.6.5 Análise dos produtos de PCR e RFLP.....	34
5.6.6 Controles.....	35
5.7 Tratamento.....	35
5.8 Análise dos resultados.....	36
6 RESULTADOS.....	37
6.1 Dados epidemiológicos.....	37
6.1.1 Número de casos.....	37
6.1.1.1 Sul e Sudoeste de Minas Gerais.....	37
6.1.1.2 Vale do Rio Doce.....	37
6.1.2 Características gerais dos pacientes.....	38
6.1.2.1 Sul e Sudoeste de Minas Gerais.....	38
6.1.2.2 Vale do Rio Doce.....	39

6.1.3 Dados ocupacionais dos pacientes.....	40
6.1.3.1 Sul e Sudoeste de Minas Gerais .....	40
6.1.3.2 Vale do Rio Doce .....	40
6.1.4 Diagnóstico no levantamento epidemiológico .....	41
6.1.4.1 Sul e Sudoeste de Minas Gerais .....	41
6.1.4.2 Vale do Rio Doce .....	41
6.1.5 Tratamento.....	43
6.1.5.1 Sul e Sudoeste de Minas Gerais .....	43
6.1.5.2 Vale do Rio Doce .....	43
6.1.6 Evolução da doença.....	45
6.1.6.1 Sul e Sudoeste de Minas Gerais .....	45
6.1.6.2 Vale do Rio Doce .....	45
6.2 Análise diagnóstica e prognóstica da casuística.....	45
7 DISCUSSÃO .....	54
7.1 Dados epidemiológicos .....	54
7.2 Diagnóstico.....	57
7.3 Tratamento.....	63
7.4 Considerações finais.....	65
8 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
ANEXOS .....	78
Anexo A: .....	78

## 1 INTRODUÇÃO

O protozoário *Leishmania* é causador das leishmanioses, as quais são caracterizadas pelo amplo espectro clínico e pela extensa distribuição mundial. As manifestações clínicas apresentadas nesta doença são bastante heterogêneas, envolvendo comprometimento cutâneo, mucoso e visceral. As leishmanioses apresentam duas formas clínicas principais, a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose cutânea (LC), também conhecida como tegumentar (LT) (CROFT, 2001). Estas formas clínicas comprometem um grande número de pessoas com lesões e danos fisiológicos que podem levar à morte. São descritos dois subgêneros de *Leishmania*, o *Leishmania* (*L.*) e o *Viannia* (*V.*) (LAINSON e SHAW, 2000). A principal forma clínica encontrada no Brasil é a tegumentar americana (LTA), cujos principais agentes causadores são a *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*.

Estes protozoários são organismos unicelulares e heteroxenos, com ciclo de vida relativamente simples envolvendo dois estágios. O primeiro ocorre no hospedeiro invertebrado, onde se desenvolve e multiplica a forma promastigota (flagelada), ingerida durante o repasto sanguíneo dos vetores (fêmeas dos flebotomíneos). Por sua vez, no segundo estágio, a forma promastigota é inoculada no hospedeiro vertebrado durante a picada do flebotomíneo, onde se diferencia em forma amastigota (sem flagelo) no macrófago.

Estima-se que cerca de 1,5 a 2,0 milhões de pessoas são infectadas anualmente, sendo a taxa de mortalidade estimada em 57 mil pessoas por ano segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças da Organização Mundial de Saúde (OMS) (SINGH et al., 2003). O desequilíbrio ecológico, agravado pela entrada e permanência do homem em habitats dos vetores é um dos fatores que tem contribuído com alto número de casos em algumas regiões.

No Brasil, a LTA é considerada uma doença em expansão e representa importante causa de morbidade para populações em regiões endêmicas (ANDRADE et al., 2005). A *L. (V.) braziliensis* é o agente etiológico de maior prevalência com distribuição geográfica em todas as regiões do país. O perfil epidemiológico da LTA é mantido pela manutenção de casos oriundos de focos antigos ou daqueles de regiões próximas às endêmicas, bem como pelo surgimento de surtos epidêmicos relacionados à expansão agrícola, implantação de áreas de garimpo, construção de estradas, o que levam o homem ao contato com o ciclo selvagem da doença (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). A epidemiologia da LTA apresenta características bastante diversas conforme a área geográfica, o que representa um desafio para

os programas envolvidos com o controle da doença. Há, portanto, necessidade de levantamentos epidemiológicos, de diagnóstico e tratamento para a elaboração de estratégias de controle relativas à LTA.

No Brasil e na região Sudeste entre 2001 a 2005, o número de casos de LTA diminuiu, mas em Minas Gerais (MG) houve uma tendência de aumento. De acordo com as médias do número de casos no Brasil, de 2001 a 2005, a região sudeste representa 9,17%, já o estado de MG é responsável por 62,87% dos casos da região sudeste. Este dado sugere a necessidade de estudos epidemiológicos em MG, bem como nas diferentes regiões deste estado.

O diagnóstico da LTA está baseado principalmente em características clínicas e epidemiológicas, achados parasitológicos e métodos imunológicos. Devido ao amplo espectro de manifestações clínicas e às limitações dos testes, como sensibilidade e/ou reatividade cruzada, a associação dos métodos laboratoriais se faz necessária para se chegar a um diagnóstico final. Neste contexto, faz-se necessário a utilização de outros métodos tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual tem se mostrado como uma importante técnica na detecção e identificação de *Leishmania* em pacientes compatíveis para LTA.

A PCR quando associada à análise de polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), fornece informações de variabilidade genética do parasita que podem ser associadas com as diferentes manifestações e formas clínicas. Nesse sentido, Berzunza-Cruz et al. (2000) ao analisarem o DNA de cinetoplasto (kDNA) por RFLP demonstraram a heterogeneidade genética apresentada nos isolados pertencentes ao complexo *Leishmania mexicana*.

Após o diagnóstico da doença, estabelece-se o tratamento com antimoniais. Todavia esta terapia possui alguns inconvenientes como resistência do parasita ao fármaco, efeitos colaterais e limitações a pacientes contra-indicados. Quando não há êxito no tratamento com o antimonial utiliza-se a anfotericina B e a pentamidina. Além da quimioterapia, a associação com a imunoterapia (vacina) vem apresentando excelentes resultados e demonstrando grande eficiência (MAYRINK et al., 2006).

As avaliações para se concluir a cura efetiva estão baseadas em critérios clínicos, sendo recomendável o acompanhamento do paciente portador de LTA. A resposta ao tratamento pode ser avaliada pelas diferenças observadas nas formas e manifestações clínicas desta doença em um número significativo de pacientes. Além disto, outro fato a ser considerado é a resistência do parasita aos fármacos administrados e uma possível associação com a variabilidade genética dos isolados, ao nível de espécie, que poderiam adaptar-se às

condições de tratamento e à resposta imunológica do hospedeiro (BERZUNZA-CRUZ et al., 2000).

Esta possível correlação pode ser investigada utilizando-se a técnica da PCR-RFLP para análise de polimorfismo da seqüência do DNA nos minicírculos que compõe o cinetoplasto e das informações relativas ao tratamento com fármacos e resistência do patógeno (SCHUBACH et al., 1998). Adicionalmente, o acompanhamento de pacientes pós-tratados com a PCR, pode auxiliar na confirmação de cura através da pesquisa de DNA de *Leishmania* no sangue periférico (COUTINHO et al., 2002).

Com a obtenção destas informações se tornaria possível uma avaliação mais adequada sobre estes isolados, contribuindo para a padronização terapêutica. Neste sentido, este trabalho avaliou os diferentes perfis epidemiológicos, de diagnóstico e tratamento da LTA, com abordagens moleculares. O material biológico para esta análise foi proveniente de diferentes regiões de MG.

## 2 JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que acometem o homem e outros animais por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Em particular, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é a principal forma clínica no Brasil. Por todo o país a LTA acomete um grande percentual da população, com algumas variações na taxa de incidência conforme a região.

As manifestações clínicas da LTA comprometem um grande número de indivíduos com lesões incapacitantes, desfigurantes, provocando além de prejuízos fisiológicos, os psicossociais, tornando a doença um problema de saúde pública. A diversidade de manifestações clínicas da LTA relatadas, bem como a eficiência do tratamento nos pacientes, envolvem diferentes respostas imunológicas, heterogeneidade genética do parasita e sua resistência aos fármacos utilizados.

A utilização de métodos apropriados para a identificação e diferenciação pela PCR-RFLP de isolados de regiões endêmicas proporciona dados de alta relevância para a correlação resposta clínica/variabilidade genética. O monitoramento terapêutico confrontado com esses dados pode fornecer importantes informações para a padronização terapêutica.

A aplicação de terapêutica apropriada proporciona tanto aos pacientes portadores da LTA, quanto aos gestores de sistema de saúde, uma maior eficiência, resultando em diminuição no tempo e custo do tratamento. Adicionalmente, informações de epidemiologia, diagnóstico e tratamento da LTA em determinadas regiões são necessárias para a elaboração de programas de controle da doença.

Este trabalho vem fornecer subsídios para integrar às informações atuais, preciosos dados para a adequação no tratamento em pacientes portadores de LTA, bem como, abrir novas perspectivas às pesquisas diante de resultados obtidos com os experimentos.

Os dados obtidos no presente estudo também contribuirão com o desenvolvimento do projeto “Eficácia do tratamento antimonial na leishmaniose tegumentar americana em regiões com diferentes níveis de incidência no estado de Minas Gerais”. Este foi financiado pelo CNPq no Edital Universal nº019/2004, que é coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Márcio de Faria e Silva.

### 3 OBJETIVOS

Fazer levantamento dos aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento de pacientes portadores de LTA das regiões sul, sudoeste e do Vale do Rio Doce, estado de MG.

Extrair DNA de amostras biológicas obtidas de pacientes com LTA e de padrões de *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis*.

Amplificar seqüências de DNA das regiões conservada e variável do minicírculo de kDNA de *Leishmania*, oriundas de amostras biológicas e de padrões, com diferentes iniciadores para a PCR.

Identificar e diferenciar *L.(L.) amazonensis* de *L.(V.) braziliensis* por meio da PCR-RFLP.

Verificar resposta clínica e laboratorial no tratamento de pacientes diagnosticados para LTA no sul, sudoeste e Vale do Rio Doce, estado de MG.

## 4 REVISÃO DA LITERATURA

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que acometem o homem e algumas espécies de animais, causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Segundo estimativa da OMS, as leishmanioses ocorrem em 88 países e em todos os continentes com exceção da Antártida e Austrália e sua notificação é compulsória em apenas 30 deles (HENIC et al., 2001). Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças da OMS, no mundo, cerca de 350 milhões de pessoas, encontram-se em áreas de risco. Anualmente, aproximadamente 1,5-2,0 milhões de pessoas sofrem desta doença, sendo a taxa de mortalidade estimada em 57 mil pessoas (SINGH et al., 2003).

A *Leishmania* é o segundo causador mais comum de doenças oriundas de protozoários em termos de novos casos e mortes, sendo ultrapassada somente pelo *Plasmodium* (CASTILHO et al., 2003). O aumento na incidência da doença deve-se em grande parte ao desequilíbrio ecológico causado pelo crescimento urbano, levando o homem ao contato direto com o vetor e os hospedeiros vertebrados que já fazem parte do ciclo de vida selvagem do protozoário.

### 4.1 Características biológicas do gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania* engloba espécies de protozoários unicelulares, heteroxenos, parasitas pertencentes à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae.

A *Leishmania* tem um ciclo de vida relativamente simples, com dois principais estágios, o promastigota flagelado no hospedeiro invertebrado, pertencente aos gêneros *Lutzomyia* - novo mundo; *Phlebotomus* - velho mundo e a forma amastigota, intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear no hospedeiro vertebrado. Esses hospedeiros podem ser representados por uma grande quantidade de mamíferos (LAINSON, 1988), entre eles, o homem.

As espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas às fêmeas de flebotomíneos quando estas sugam sangue de vertebrados infectados. Nesta circunstância os flebotomíneos ingerem juntamente com o sangue, as formas amastigotas, localizadas dentro dos macrófagos. As formas amastigotas não possuem flagelos e são morfológica e bioquimicamente distintas das formas promastigotas, além de serem parasitas intracelulares obrigatórios do sistema fagocítico mononuclear. No interior do tubo digestivo dos insetos o sangue ingerido

juntamente com as formas amastigotas de *Leishmania* é digerido e finalmente as amastigotas se diferenciam em promastigotas, que são flageladas. Nos flebotômíneos o parasito se desenvolve em meio extracelular na luz do trato digestivo. Estas formas migram para outras regiões do tubo digestivo dos insetos de acordo com o subgênero; *L.*, porção anterior e *V.*, porção posterior. As formas promastigotas no inseto posteriormente se diferenciam em promastigotas metacíclicas (formas infectantes) e migram para a região anterior do tubo digestivo do inseto em um número tão elevado que chega a provocar a regurgitação do inseto durante o repasto sangüíneo. Quando o inseto se alimenta novamente de sangue em hospedeiros vertebrados, as formas promastigotas são inoculadas e fagocitadas por macrófagos, nos quais se diferenciam em formas amastigotas e todo o ciclo reinicia.

#### **4.2 Formas clínicas**

A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro, mas não existe uma correlação direta entre forma clínica específica e espécie causal (CASTILHO et al., 2003).

Existem duas formas clínicas principais da doença, a leishmaniose visceral e a leishmaniose cutânea ou tegumentar, que por sua vez, subdivide-se em um número de outras manifestações cutâneas, incluindo cutâneo-mucosa, cutânea difusa, e dermatológica pós-kalazar (CROFT, 2001). A forma visceral acomete principalmente órgãos como baço, medula-óssea e fígado. Devido à presença da *Leishmania* nestes órgãos, há hepato e esplenomegalia, acompanhadas de anemia, que em alguns casos pode levar o indivíduo à morte, quando não-tratados. A forma tegumentar determina uma lesão cutânea na região da picada, que se caracteriza por uma ferida de aspecto pápulo-eritematoso ou furunculóide ou pápulo-ulcerado. Estas lesões podem ser únicas ou em maior número. Depois de anos, se não tratada a doença, há comprometimento da mucosa oronasal e faríngea, e o nariz e a boca podem ficar desfigurados ou destruídos permanentemente. A deformação do nariz origina o que é conhecido como "nariz-de-tapir" ou "focinho-de-anta". Não se sabe ao certo o que leva ao comprometimento mucoso, mas tratamento tardio, concentrações de drogas inadequadas e até mesmo o tipo de agente etiológico, são alguns dos fatores que podem levar a este tipo de manifestação cutânea.

Estas formas que comprometem um grande número de indivíduos com lesões incapacitantes, desfigurantes e algumas vezes fatais, como nas leishmanioses viscerais, levaram a OMS a incluir esta doença entre as seis mais importantes do mundo.

### 4.3 Dados epidemiológicos sobre a leishmaniose tegumentar americana no Brasil

No Brasil a forma clínica das leishmanioses que mais ocorre é a cutânea ou tegumentar. Esta forma ocorre nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O foco mais importante é o sul-americano, que compreende todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile. No Brasil, os agentes causadores da LTA são a *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e outras espécies relacionadas. A doença acomete mais frequentemente os trabalhadores que invadem as florestas tropicais ou residem próximos a elas. Contudo, tem-se observado uma mudança no padrão epidemiológico de transmissão da leishmaniose em diversos países, como Bolívia, Brasil, Peru e Venezuela, com uma importante domiciliação de vetores (MARZOCHI, 1994; CAMPBELL et al., 2001 e PASSOS et al., 2001). Deste modo, o pensamento de que a LTA com o desflorestamento desapareceria na América do Sul tem sido revisto. Estes exemplos constituem uma convincente evidência de que o aumento da domiciliação da transmissão está bem caracterizado em algumas áreas do Brasil (BRANDÃO et al., 1999, DESJEUX, 2001 e GUERRA et al., 2006).

Do total de casos já registrados de leishmaniose tegumentar, 90% ocorreram em apenas seis países: Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Brasil e Peru (WHO, 1990).

No Brasil, surtos epidêmicos têm ocorrido nas regiões sudeste, centro-oeste, nordeste e mais recentemente na região amazônica relacionados ao processo predatório de colonização, sendo a taxa de incidência de leishmaniose tegumentar no período de 1993 a 2003, de 13,5 a 22,9 casos a cada 100 mil habitantes. Ao longo desse período observou-se uma leve tendência de crescimento da endemia, registrando os coeficientes mais elevados nos anos de 1994, 1995 e 2001; quando atingiram níveis de 22,8, 22,9, e 22,4 casos/100 mil habitantes, respectivamente. Vale ressaltar que no ano de 1998 houve uma queda significativa na taxa notificada (13,5 casos/100 mil habitantes), fato que pode estar relacionado a problemas operacionais ocorridos naquele ano, afetando a coleta de dados. Observa-se ainda, que a região norte apresenta as taxas mais elevadas do país, com uma média no período de 94,5 casos/100 mil habitantes, seguida das regiões centro-oeste (42,3 casos/100 mil habitantes) e nordeste (24,6 casos/100 mil habitantes) (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

No período de 2001 a 2005; no Brasil e na região Sudeste, o número de casos de LTA tem diminuído, mas em MG houve uma tendência de aumento. A média de casos nos últimos 10 anos (1995-2005) foi de 34.129 casos por ano no Brasil, 3.129,7 casos na região sudeste e

1.967,8 casos no estado de MG (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Mesmo tendo queda no número de casos de leishmaniose tegumentar americana no período de 2001 a 2005, o número é ainda alto, o que justifica o acompanhamento desta doença pelas autoridades de saúde, visto a possibilidade de novos surtos epidêmicos.

Com taxas de incidência altas, não só no Brasil, como em outros países do novo mundo, a LTA constitui um problema de saúde pública. Sua importância reside não somente na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo, mas também na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica.

#### **4.4 Diagnóstico**

Os métodos diagnósticos nas leishmanioses disponíveis até o momento estão baseados principalmente em características clínicas e epidemiológicas, achados parasitológicos e métodos imunológicos. Frequentemente a associação de alguns desses elementos é necessária para se chegar ao diagnóstico final. O diagnóstico precoce é importante, pois evita lesões severas da forma cutânea (HENIC et al., 2001). Todavia não existe um único método laboratorial que possa ser utilizado como padrão ouro para o diagnóstico da LTA.

O diagnóstico clínico da LTA pode ser feito com base na característica da lesão que o paciente apresenta associado à anamnese, onde os dados epidemiológicos são de grande importância. As formas tegumentares do novo mundo compreendem uma síndrome cujas manifestações clínicas dependem de alguns fatores, como a espécie de *Leishmania* envolvida e a relação do parasito com seu hospedeiro.

A LTA produz amplo espectro de lesões, o que dificulta a rapidez e simplicidade do diagnóstico clínico. Portanto, deve ser feito o diagnóstico diferencial de outras dermatoses granulomatosas que apresentam lesões semelhantes a LTA e que podem ser confundidas, tais como blastomicose, esporotricose, úlcera tropical e neoplasias.

O diagnóstico parasitológico envolve a pesquisa do parasito, onde sua demonstração pode ser feita do material obtido da lesão existente através de diferentes exames, descritos a seguir. No exame direto de aposição de biópsias coradas, após anestesia local, pode-se fazer biópsias ou curetagem nas bordas da lesão, retirando-se um fragmento no qual é confeccionado lâmina por aposição, e corado por derivados de Romanowsky, Giemsa ou Leishman. No exame histopatológico, o fragmento de pele obtido pela biópsia é submetido a técnicas histológicas de rotina e exame por um patologista. O encontro de amastigotas ou de

um infiltrado inflamatório compatível pode definir ou sugerir o diagnóstico, respectivamente. A cultura pode ser feita de fragmentos do tecido ou de aspirados dos bordos da lesão e de linfonodos infartados de áreas próximas a esta. Existem diversos meios apropriados para cultivo de *Leishmania*, como o de Neal, Novy e Nicolle (NNN) que é o mais utilizado, pois aumenta a probabilidade de isolamento do parasito associado a um meio líquido. A inoculação em animais é geralmente feita no focinho ou patas de hamster por via intradérmica. É inoculada uma solução do fragmento triturado com objetivo de isolamento do patógeno de bordas das lesões.

O diagnóstico imunológico mais empregado no Brasil é o teste da intradermorreação de Montenegro (IDRM) ou também conhecido por Teste de Montenegro (TM). Essa metodologia possibilita a avaliação da hipersensibilidade tardia uma vez que, imunologicamente, a LTA se caracteriza pelo aparecimento de resposta celular durante a doença e após a cura da infecção, seja de forma espontânea ou após tratamento. A IDRM é de grande valor presuntivo no diagnóstico de LTA, constituindo valioso recurso diagnóstico nos casos em que os parasitas são escassos ou ausentes, sendo também bastante útil nos inquéritos epidemiológicos de áreas endêmicas. Estima-se uma positividade de 84,0 e 100,0% nas formas cutânea e mucocutânea, respectivamente e é habitualmente negativo nas formas cutâneas difusas e nos pacientes imunodeprimidos (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

Outros métodos imunológicos aplicados são as reações sorológicas para a avaliação da resposta humoral na LTA. Os resultados obtidos pela reação imunoenzimática (ELISA) têm sido semelhantes aos de imunofluorescência indireta (RIFI) (MARQUES et al., 2006). São técnicas com uma sensibilidade razoável, porém com possibilidade de reações cruzadas, especialmente com a doença de Chagas e Calazar (FURTADO, 1994). As reações sorológicas apresentam resultados variáveis na LTA, quer pela reduzida antigenicidade do parasita ou pelos baixos níveis de anticorpos circulantes. Habitualmente negativa na forma cutânea difusa, sua sensibilidade foi estimada em 71% nas formas cutânea e 100% na forma mucosa (LACERDA, 1994). Nos casos positivos, os títulos médios são significativamente mais elevados naqueles que apresentam múltiplas lesões, refletindo a maior antigenicidade induzida pelo maior número de parasitas. Outros testes como de hemaglutinação indireta e contra-immunoeletoforese não têm sido superiores a RIFI e nem acrescentam maiores informações para o diagnóstico da LTA.

#### 4.5 Pesquisa do DNA do parasito

Os métodos tradicionais de diagnóstico de *Leishmania*, mesmo quando usados em associação, não são capazes de diagnosticar todos os casos de LTA (LOPEZ et al., 1993). Assim sendo, busca-se suprir eventuais deficiências dos métodos empregados na pesquisa da presença da *Leishmania* no homem e em animais.

Deste modo o uso da PCR, tem se mostrado como uma nova opção de diagnóstico, principalmente em função de sua elevada sensibilidade (RODGERS et al., 1990; DE-BRUJIN et al., 1993; LOPEZ et al., 1993; RODRIGUEZ et al., 1994; PASSOS et al., 1999; PIRMEZ et al., 1999; MARQUES et al., 2001 e ANDRADE et al., 2006). A PCR permite a amplificação in vitro de seqüências específicas de DNA, usando-se dois iniciadores, que hibridizam com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Nesse processo, o DNA é desnaturado (94-96°C), os iniciadores são hidridizados (30-60°C) e posteriormente a síntese de DNA é feita à temperatura de 72°C em média, com DNA-polimerase de *Thermus aquaticus* (Taq-DNA-polimerase) e desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dNTPs). A repetição dessas etapas, por 20 a 35 ciclos, permite a amplificação de um segmento de DNA.

A PCR possui várias aplicações, tais como, amplificação de regiões específicas do genoma ou de DNA complementar (cDNA), análise de polimorfismos de DNA, diagnósticos de doenças genéticas, estudos de evolução molecular, medicina forense e diagnóstico de doenças infecciosas. Como a PCR tem uma elevada sensibilidade no diagnóstico, cuidados especiais devem ser tomados com possíveis contaminações com DNAs exógenos.

Os métodos baseados em PCR para detectar espécies de *Leishmania* em amostras clínicas têm sido aperfeiçoados para amplificar genes de miniexon, regiões do DNA codificadoras das subunidades ribossomais (CUPOLILLO et al., 2003), kDNA (DEGRAVE et al., 1994), e outras seqüências de DNA nuclear (NOYES et al., 1998). Estes métodos são de especificidade variada; alguns detectam todas as espécies de *Leishmania* conhecidas, enquanto outros identificam o parasita ao nível de gênero e subgênero (NOYES et al., 1998).

A PCR permite uma rápida detecção da *Leishmania* sem necessidade de isolamento em cultura. Esta técnica tem sido validada extensivamente no diagnóstico da LTA em humanos e outros animais suspeitos de infecção (DE-BRUJIN et al., 1993; LOPEZ et al., 1993; RODRIGUEZ et al., 1994; GONTIJO, 1997; PASSOS et al., 1999; PIRMEZ et al., 1999 e ANDRADE et al., 2006). Para o diagnóstico das leishmanioses, um dos principais alvos das técnicas moleculares desenvolvidas até o momento é o kDNA (RODGERS, et al., 1990;

BELLI et al., 1998; PIRMEZ et al., 1999; ROMERO et al., 2001; SAFAEI, et al., 2002 e BASTRENTA et al., 2003). Esta estrutura é constituída de uma rede de DNA que se organiza concatenadamente em milhares de moléculas circulares. Os dois tipos de moléculas de DNA presentes no cinetoplasto são os maxicírculos e os minicírculos. Enquanto os maxicírculos do kDNA possuem de 20 a 40 kb de tamanho e apresentam em torno de 30 a 50 cópias, os minicírculos possuem usualmente um tamanho de 1 kb e apresentam 10.000 a 20.000 cópias de seqüências de kDNA/parasito (RODGERS et al., 1990) (Figura 1).

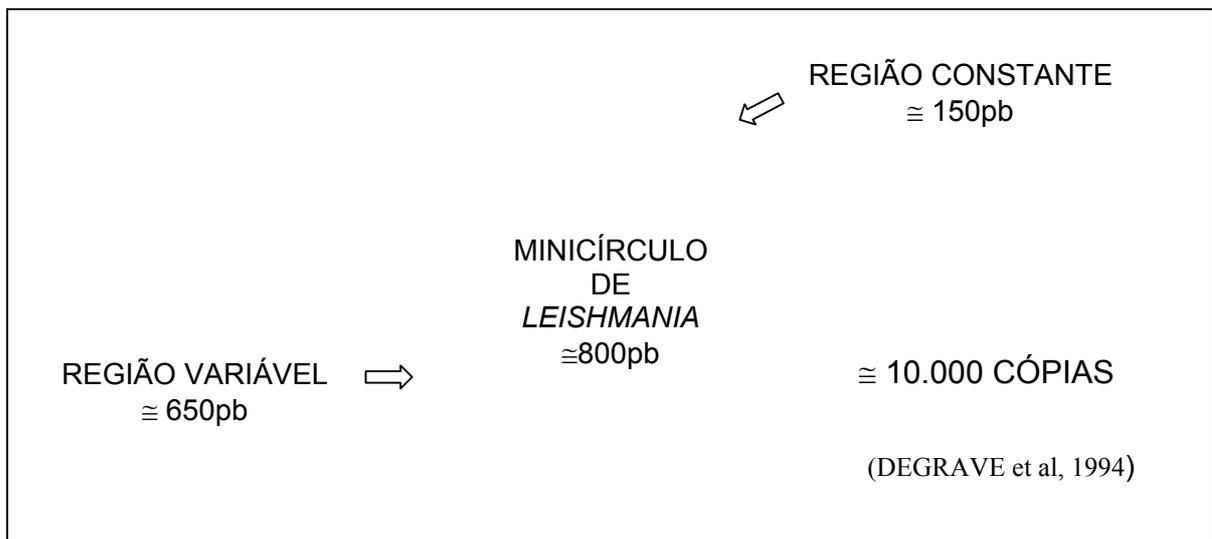


Figura 1 - Diagrama do minicírculo do kDNA de *Leishmania*, subgêneros *Viannia* e *Leishmania* e o local de anelamento dos iniciadores, usados na PCR.

O minicírculo do kDNA de *Leishmania* tem sido alvo de sondas na realização da hibridização, com o objetivo de identificar, caracterizar e diagnosticar espécies de *Leishmania*, contribuindo decisivamente para sensibilidade e a especificidade da metodologia em questão (WIRTH e MCMAHON-PRATT, 1982; BARKER et al., 1986; BARKER, 1989; RODGERS et al., 1990; DE-BRUJIN e BARKER, 1992 e DEGRAVE et al., 1994). Nos minicírculos do kDNA há uma região de seqüência nucleotídica conservada que possui em torno de 200pb e uma variável que possui em torno de 700-800pb (RODGERS et al., 1990). Essa heterogeneidade é freqüentemente alvo de muitos trabalhos envolvendo o parasito. Neste sentido, alguns iniciadores têm sido desenvolvidos, para flanquear e amplificar estas regiões através da PCR. Os iniciadores 150 e 152 (150/152) são direcionados para amplificação da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania* gerando fragmentos em torno de 120 pares de bases (pb) (DEGRAVE et al., 1994 e PASSOS et al., 1996). Outros iniciadores

como o 13Y e 13Z (13Y/13Z) estão relacionados com a amplificação da região não conservada do minicírculo o que leva a fragmentos com diferentes tamanhos, conforme algumas espécies (RODGERS et al., 1990). Estes iniciadores, portanto, permitem a diferenciação entre gêneros e espécies de *Leishmania* e tornam-se assim, valiosas ferramentas no diagnóstico e identificação de isolados em pacientes com LTA.

Além dos estudos clínicos, a PCR tem se mostrado um eficiente instrumento em estudos epidemiológicos, pois uma identificação mais rápida e precisa do parasito é alvo de pesquisas, a partir dos critérios assinalados por RODRIGUEZ et al. (1994): a) Identificação direta e rápida de parasitos em vetores, em reservatórios e em biópsias de tecidos de pacientes; b) Habilidade para distinguir diferentes espécies patogênicas; c) Fácil aplicação em países onde a doença é endêmica. Ainda vale ressaltar que a PCR é capaz de amplificar genes do kDNA de *Leishmania*, mesmo a partir de DNA total degradado. Esta característica do kDNA, justifica seu emprego como alvo na PCR, visto sua menor degradação.

Em certas regiões endêmicas pode ocorrer a presença de mais de uma espécie de *Leishmania*; deste modo, a aplicação da PCR-RFLP torna-se de grande relevância; já que tem sido usada no estudo da heterogeneidade de populações de *Leishmania* (KAPOOR et al., 1998), na classificação taxonômica (CUPOLILLO et al., 2000) e na diferenciação de espécies deste parasito (VOLPINI et al., 2004). Recentemente, Berzunza-Cruz et al. (2000) utilizaram a RFLP em amostras purificadas do kDNA de isolados e obtiveram padrões de restrição relacionados com o comportamento clínico. Com isto a RFLP pode fornecer subsídios para a adequação do tratamento e para o monitoramento da terapêutica.

#### 4.6 Tratamento

O tratamento da LTA foi introduzido utilizando o antimonial tártaro emético. Durante muitos anos o tratamento não obteve uma grande evolução, havendo simplesmente a mudança do antimônio trivalente ( $Sb^{III}$ ) pelo pentavalente ( $Sb^V$ ). Essa mudança ocorreu em função das elevadas ocorrências de efeitos colaterais quando comparados ao uso na forma pentavalente. Os principais antimoniais atualmente usados são o Pentostam (Wellcome Laboratories Ltd.) e Glucantime (Aventis).

O Ministério da Saúde (MS) preconiza o uso de 15mg  $Sb^V$ /Kg/dia, durante 20 dias, para a leishmaniose cutânea localizada e disseminada, 20mg  $Sb^V$ /kg/dia, durante 20 dias para a forma difusa e 20mg  $Sb^V$ /kg/dia durante 30 dias para a forma mucosa e cutaneomucosa (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). No entanto é observado alto índice de recidivas

neste esquema de tratamento. Neste sentido, esquemas terapêuticos alternativos têm sido propostos. Um esquema que tem apresentado bons resultados é de 17mg Sb<sup>V</sup>/Kg/dia por 10 dias. É feito um intervalo de 10 dias e novamente inicia-se outra série de tratamento por 10 dias. A dose máxima via parenteral deve ser de 10 mL, independentemente do peso do paciente. Recomenda-se a continuação do tratamento até completa cicatrização da úlcera (MAYRINK et al., 1976).

Os efeitos colaterais mais freqüentes nos pacientes submetidos ao tratamento com antimonial são artralgia, mialgia, inapetência, cefaléia, febre, vômitos, tontura, e inchaço no local da aplicação. A cardio, nefro e hepatotoxicidade constituem uma importante limitação à segurança dos antimoniais.

A variação na resposta clínica aos antimoniais pentavalentes tem sido um problema persistente no tratamento de leishmanioses nos últimos 50 anos. Existe uma diferença intrínseca na sensibilidade das espécies a estes antimoniais (CROFT, 2001). Considera-se a heterogeneidade da resposta ao antimônio entre diferentes espécies de *Leishmania* como propriedades inatas ou resistência adquirida e o resultado é devido a condições não ideais de tratamento (MOREIRA et al., 1998). A resistência a drogas é um sério problema para o tratamento de várias doenças, desde infecções bacterianas e parasitológicas até o câncer. A carência na resposta à quimioterapia convencional é de interesse para o estudo das causas de resistência em leishmanioses (ANACLETO et al., 2003). O mecanismo de resistência aos compostos de antimônio não está bem claro e fatores tais como mudanças na farmacocinética e pureza da droga, concentrações sub-ótimas e estado imune do hospedeiro têm sido citados como causas aparentes da resistência ou falência à resposta ao tratamento (ABDO et al., 2003). Várias alterações no parasita impedem o sucesso da terapia. A mudança nos minicírculos e maxicírculos de kDNA podem ser induzidas por drogas como arsenito e termicacina (LEE et al., 1993), conferindo em certos casos resistência. O kDNA de trypanosomatídeos é altamente variável, especialmente os minicírculos (LEE et al., 1992). O papel do transportador ABC (PGPA) nos mecanismos de resistência ao antimônio em amastigotas envolve a redução no acúmulo da droga no parasita (FADILI et al., 2005) pelo aumento da expressão gênica responsável pela codificação do PGPA e outras enzimas relacionadas. A aquagliceroporina (AQP1) é o transportador responsável pelo acúmulo de Sb<sup>III</sup> nas células de *Leishmania*. Em isolados resistentes a esta droga, os níveis de AQP1 são reduzidos (MARQUIA et al., 2005), impedindo o transporte de Sb<sup>III</sup> até as células, por mudanças na modulação gênica. Finalmente vale ressaltar que as características do parasito e

do hospedeiro podem ser responsáveis pelos aspectos clínicos da doença (CUPOLILLO et al., 2003).

A diferença na sensibilidade das espécies de *Leishmania* diante do tratamento é extremamente complexa, e envolve o polimorfismo das apresentações clínicas das espécies provenientes de diferentes áreas geográficas (BERZUNZA-CRUZ et al., 2000), levando a necessidade de adequação do tratamento. Neste contexto, as maiores conseqüências para a ineficácia do tratamento são o comprometimento mucoso e os custos gerados.

O MS sugere o desenvolvimento adequado de diferentes métodos de detecção das alterações nas espécies de *Leishmania* que geram mudanças no perfil de sensibilidade aos antimoniais (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). O uso da PCR-RFLP pode contribuir relevantemente para caracterizar isolados de espécies de *Leishmania* pelo emprego de enzimas de restrição. Este método é capaz de detectar pequenas diferenças entre moléculas de DNA pelo comprimento dos fragmentos obtidos. Deste modo, a RFLP é uma importante ferramenta para a descoberta de polimorfismo apresentado pelo parasita, permitindo estabelecer correlação com diferentes respostas clínicas na LTA (BERZUNZA-CRUZ et al., 2000).

A anfotericina B, antibiótico poliênico de reconhecida ação leishmanicida, é a droga de segunda escolha empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial. Outro fármaco de segunda escolha é a pentamidina (LIMA et al., 2007).

Como parte do tratamento a imunoterapia vem apresentando excelentes resultados a custos reduzidos. É utilizado como antígeno uma vacina preparada para imunoprofilaxia (Leishvacin Biobrás). Esta é outra alternativa diante dos casos onde o uso do antimonial é contra-indicado (cardiopatas, nefropatas, mulheres grávidas, idosos, etc) e nos sinais de resistência a esta classe de medicamentos (MAYRINK et al., 1992). A eficiência da imunoterapia via sub-cutânea (95%) é maior do que da intramuscular (76%). A associação da imunoterapia com a quimioterapia vem mostrando excelente resultado na cura dos pacientes e na redução no tempo de tratamento e, conseqüentemente na quantidade de antimonial recebida (GENARO et al., 1996 e MAYRINK et al., 2006).

#### **4.7 Critérios de cura**

O critério de cura para a LTA é usualmente clínico. Uma vez que os pacientes portadores de LTA são tratados principalmente com antimoniais, o desenvolvimento de resistência a esses fármacos interfere significativamente na resposta e cura clínica.

A variação na eficácia de drogas no tratamento de leishmanioses é devido a diferenças de sensibilidade das espécies de *Leishmania* às drogas, ao estado imune do paciente ou às propriedades farmacocinéticas (CROFT, 2001).

Várias ferramentas são utilizadas na avaliação do tratamento e na constatação da cura. Os métodos de pesquisa, cultivo e isolamento do parasito das lesões, não são suficientes devido à sua baixa sensibilidade, requerendo outros métodos para a definição de cura. Entre os métodos usados destacam-se o TM, a própria pesquisa do parasito, outros testes sorológicos, mas a biologia molecular vem obtendo uma posição de destaque (SCHUBACH et al., 1998).

O encontro do parasito é inversamente proporcional à evolução clínica da lesão, determinando que a diminuição do seu número não significa necessariamente a cura da doença (SCHUBACH et al., 1987). A maioria das lesões resultantes de recidiva é parasitologicamente negativa (WEIGLE e SARAIVA, 1996). A presença da *Leishmania* é necessária, mas não implica no surgimento de sinais clínicos.

Nos estudos onde há reinfecção e reativação, análises do esquizodema do kDNA ou o uso da PCR na região variável do minicírculo, podem ser usadas para se avaliar a variabilidade de isolados presentes nas lesões de pacientes com LTA na primeira infecção e na reinfecção (SARAIVA et al., 1990 e SCHUBACH et al., 1998).

Apesar da resposta imune celular ser a principal responsável na resolução da infecção de LTA no organismo humano, a resposta imune humoral não tem seu papel ainda bem definido na evolução clínica da doença; contudo a OMS recomenda o acompanhamento do tratamento com avaliação sorológica quantitativa, pois há uma diminuição de títulos com o tratamento (WHO, 1990).

Com a associação dos métodos de diagnóstico, no intuito de avaliar a possível cura da doença, recomenda-se acompanhamento mensal por três meses consecutivos e após a cura clínica, seguimento de até doze meses após o término do tratamento. Na forma cutânea o critério para cura é definido pelo aspecto clínico das lesões, reepitelização, regressão total da infiltração e eritema, até três meses após a conclusão do esquema terapêutico. Na forma mucosa, pela regressão de todos os sinais e comprovado pelo exame otorrinolaringológico, até seis meses após a conclusão do esquema terapêutico (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Em alguns casos, mesmo após a confirmação de cura, alguns pacientes de regiões endêmicas são acompanhados pelos serviços de saúde, sendo que o uso da PCR pode auxiliar

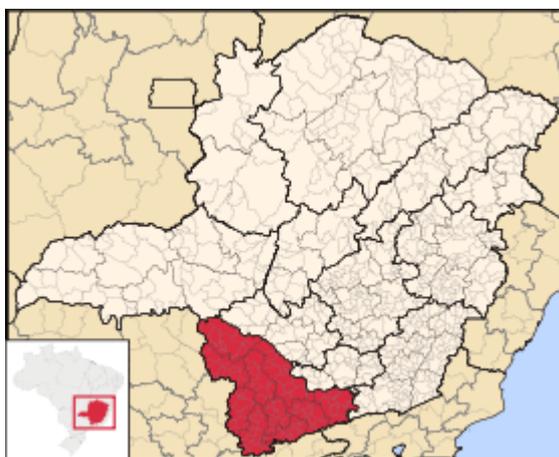
na confirmação pela pesquisa de DNA de *Leishmania* no sangue periférico (COUTINHO et al., 2002).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Levantamento epidemiológico

Foi realizado levantamento epidemiológico de 824 pacientes portadores de LTA com dados coletados no período de 2002 a 2006 provenientes das regiões sul e sudoeste do estado de Minas Gerais (SSMG) e também do Vale do Rio Doce (VRD). Os dados do SSMG foram obtidos pelo programa Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN). Estes dados estavam organizados em planilhas do programa Excel e foram obtidos das fichas de investigação de LTA das Gerências Regionais de Saúde (GRS) das cidades de Alfenas, Passos, Pouso Alegre e Varginha. Os dados do VRD foram obtidos do ambulatório de Leishmanioses “Dr. Paulo Araújo Magalhães” de Caratinga – MG e do Sistema de Informações de Leishmaniose (SIL). Este ambulatório tem o apoio da Secretaria Estadual de Saúde e é um centro de referência para o atendimento de pacientes com LTA desde 1965, principalmente nos serviços de diagnóstico e tratamento da doença.

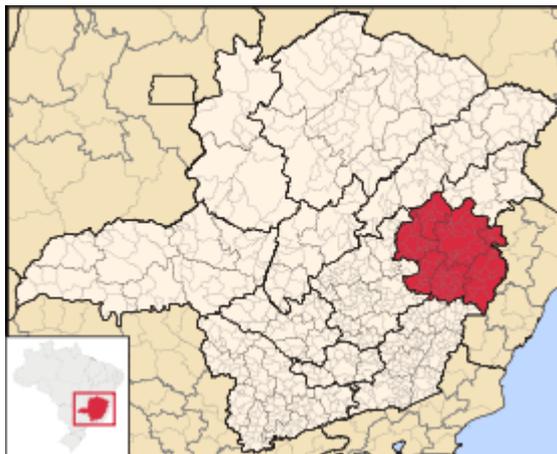
A região SSMG, mostrada na figura 2 em destaque, possui 54.614 km<sup>2</sup>, 154 municípios e população aproximada de 2,6 milhões de habitantes.



Fonte: [pt.wikipedia.org/wiki/Mesorregi%C3%A3o\\_do\\_Sul\\_e\\_Sudoeste\\_de\\_Minas\\_Gerais](http://pt.wikipedia.org/wiki/Mesorregi%C3%A3o_do_Sul_e_Sudoeste_de_Minas_Gerais), acesso em 08/07/2007

Figura 2: Região Sul e Sudoeste de Minas Gerais.

Por sua vez a região do VRD, mostrada na figura 3 em destaque, possui uma área de 41.809 km<sup>2</sup>, 102 municípios e população aproximada de 1,6 milhões de habitantes.



Fonte: [pt.wikipedia.org/wiki/Mesorregi%C3%A3o\\_do\\_Vale\\_do\\_Rio\\_Doce](http://pt.wikipedia.org/wiki/Mesorregi%C3%A3o_do_Vale_do_Rio_Doce), acesso em 08/07/2007

Figura 3: Região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais.

Foram avaliados fatores sócio-demográficos, tais como sexo, idade, raça/cor de pele, local de nascimento, escolaridade, ocupação e local da residência.

## 5.2 Casuística

Foram coletadas amostras biológicas de 39 pacientes com lesões sugestivas de LTA, sendo 23 do VRD e 16 das GRS de Alfenas, Passos, Pouso Alegre e Varginha (SSMG).

Para inclusão dos pacientes neste estudo, foram usados os seguintes critérios: presença de lesão sugestiva; histórico de não-tratamento para LTA, já que são pacientes que apresentaram possibilidade de serem portadores de LTA pela primeira vez; TM e/ou exame parasitológico positivo e histopatológico compatível e/ou positivo. Foi realizada uma avaliação clínica inicial para o diagnóstico diferencial em relação a outros tipos de lesões, tais como: úlcera varicosa, blastomicose e esporotricose. Clinicamente as funções cardíacas foram avaliadas pela aferição da pressão arterial e pela análise do eletrocardiograma. Estas análises tiveram como responsáveis os clínicos que atuam no ambulatório de Leishmanioses de Caratinga, Dr. Alfredo Grigorevisk Filho e Dr. Cláudio Lellis Figueira de Souza que atende no Sistema Único de Saúde (SUS) na cidade de Alfenas.

Foi solicitado consentimento livre e esclarecido, oral ou por escrito aos voluntários e seus respectivos responsáveis, os quais, após o esclarecimento dos objetivos da pesquisa, do protocolo e dos procedimentos que foram realizados, bem como dos riscos e benefícios, aceitaram a participação no estudo.

### 5.3 Coleta de material biológico

A coleta de biópsia das lesões foi feita após antissepsia e injeção via subcutânea de 0,5 a 1,0 mL de xilocaína a 2%, próximo ao local. Com o uso de cunha e/ou cilindro retirou-se um pequeno fragmento de tecido, de mais ou menos 6,0 mm de tamanho da borda da lesão ulcerada. Após a retirada do excesso de sangue da biópsia em papel absorvente, foi confeccionado um esfregaço a partir da aposição da face interna da biópsia em lâmina seguido de fixação em metanol e coloração pelo Giemsa. Após confecção do esfregaço o material foi colocado em Tris-EDTA (TE) e congelado a -20°C.

Para o exame histopatológico uma outra biópsia foi realizada conforme procedimento descrito anteriormente e colocada em formol tamponado 10%.

Para isolar as formas promastigotas de *Leishmania* foi feito um aspirado com 0,1 mL de salina da borda da lesão. Após retirada da salina com o material da biópsia o aspirado foi colocado em meio NNN/Schneider.

O meio NNN foi preparado adicionando 85 mL de água previamente aquecida a 1,4g de agar. Em seguida essa solução foi colocada na autoclave a 120°C por vinte minutos e resfriada até 48°C - 52°C. Em capela foram adicionados 15% de sangue defibrinado e inativado a 56°C por 30 minutos e finalmente foi feita a distribuição de 3mL de meio por tubo, deixando-o inclinado até a polimerização ( $\pm$  20 a 30 minutos) do agar sangue. A preparação do meio Schneider seguiu as seguintes etapas: em 80mL de água deionizada autoclavada, à temperatura de 15-20°C, foram adicionados 2,45g de Schneider aos poucos até dissolução. Adicionou-se 0,04g de bicarbonato de sódio e aferiu-se o pH (em torno de 5,0). Ajustou-se o pH para 9,0 com hidróxido de sódio 5N. Após o ajuste, deixou-se 15 minutos em agitação. Ajustou-se, o pH para 6,9 com ácido clorídrico 1N. Vale ressaltar que o ajuste de pH, de 9,0 a 6,9, teve como objetivo evitar a precipitação dos sais presentes no meio. Adicionou-se 0,06g de cloreto de cálcio dissolvido em 5mL de água no meio que estava em constante agitação. Em seguida, ajustou-se o pH para 7,1. Completou-se o volume para 100mL. O meio foi filtrado usando membrana de 0,22 micrômetros. Após esse procedimento adicionou-se 10mL de soro fetal bovino estéril. No último passo foram acrescentados os antibióticos nas seguintes concentrações: penicilina 100 UI/mL; estreptomicina 100 µg/mL e gentamicina 40 µg/mL.

#### **5.4 Análise imunológica**

A análise imunológica foi realizada através do TM, conforme descrita por Melo et al. (1977). Neste teste foi utilizado antígeno de *Leishmania* (Biobrás) injetado por via intradérmica (0,1mL) na face anterior do antebraço. Após 48 horas foi feita a leitura da área de endureção com auxílio de régua milimetrada. Foram considerados positivos os testes cujo diâmetro era igual ou superior a 5mm.

#### **5.5 Análise parasitológica e histopatológica**

Foi realizada pesquisa direta da forma amastigota do parasito pela microscopia óptica em aposições de biópsias. No VRD foram confeccionadas 3 lâminas para cada paciente e no SSMG, 2. O resultado do exame direto da forma amastigota só foi obtido após exame exaustivo de todos os esfregaços confeccionados para cada paciente.

A análise histopatológica foi realizada conforme descrita por Magalhães et al. (1986). Uma biópsia foi coletada conforme descrito no item 5.3 e colocada em formol 10% tamponado para avaliação. O material biopsiado foi colocado em parafina e posteriormente foi feito cortes histológicos para coloração com eosina e hematoxilina. Nestes cortes foi realizada pesquisa direta da forma amastigota do parasito pela microscopia óptica associada a uma avaliação das alterações teciduais. A análise foi considerada positiva quando se encontrou o parasita e/ou modificações teciduais foram compatíveis com a presença do mesmo.

A outra forma de avaliação parasitológica foi o cultivo do material aspirado em meio NNN/Schneider à temperatura de 24° C, para isolamento da forma promastigota do parasito. As culturas foram mantidas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básicas do Departamento de Ciências Biológicas da UNIFAL – MG. Para a manutenção dos isolados por um período maior, as culturas foram criopreservadas.

##### **5.5.1 Criopreservação**

A criopreservação foi realizada em nitrogênio líquido a -196°. Essa técnica pode assegurar a conservação de material biológico por longos períodos de tempo, uma vez que nas temperaturas ultrabaixas o metabolismo celular fica tão reduzido que a deterioração biológica é paralisada.

A criopreservação foi feita conforme as seguintes etapas: preparou-se a glicerina autoclavada, que deve ser 10% do volume total de cultura de *Leishmania* a ser criopreservada. A adição da glicerina no tubo de criopreservação foi gota em gota. Os tubos de criopreservação foram colocados em um banho de gelo e levados posteriormente para um freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Após esse processo os tubos foram colocados a  $-70^{\circ}\text{C}$  *overnight*. Em seguida, os tubos foram colocados em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  para criopreservação. Os tubos criopreservados contendo promastigotas de *Leishmania* estão mantidos no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da Universidade de Alfenas (UNIFENAS).

## 5.6 Análise molecular

Foi empregada a PCR para o diagnóstico e monitoramento de cura do material biológico de 39 pacientes (biópsias; cultura de *Leishmania* isolada de pacientes e de cepas referência; lâminas com aposição de tecido da lesão; esfregaço sangüíneo) e a PCR-RFLP para diferenciar *L. (V.) braziliensis* de *L. (L.) amazonensis*.

### 5.6.1 Extração

A extração de DNA das amostras provenientes de biópsias das lesões foi feita a partir da digestão enzimática com proteinase K, conforme descrita por Passos et al. (1999). A extração de DNA de lâminas (aposição) foi realizada segundo Belli et al. (1998) e a de culturas de *Leishmania* (número de promastigotas na ordem de  $10^6$ ) através do *Wizard<sup>TM</sup> Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA), conforme orientação do fabricante e pela técnica do fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989). A extração de DNA a partir de esfregaço sangüíneo em lâmina pós-tratamento foi realizada segundo Marques et al. (2001).

### 5.6.2 Análise do material extraído

A visualização do material extraído foi realizada em gel de agarose a 0,8%, o qual foi preparado utilizando-se Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5% e brometo de etídeo (EtBr) ( $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). No gel foi colocado um marcador de concentração ( $\lambda$ /HindIII) e em seguida as amostras ( $5\mu\text{L}$  amostra para  $2\mu\text{L}$  de tampão de corrida). A eletroforese foi realizada em cuba submarina (Amersham Biosciences) por 60 min a 80 Volts. O gel foi observado em transluminador de luz ultra violeta (UVP-Transilluminator; Modelo TM-36, USA) e sua

imagem armazenada, usando o sistema digital Kodak (modelo EDAS-290). Em seguida foi analisada a qualidade do DNA extraído e a quantificação do mesmo por comparação com o padrão  $\lambda$ /HindIII. O programa de quantificação de DNA Kodak (modelo EDAS-290) foi empregado nesta quantificação. Uma vez quantificados, os DNAs foram usados nas reações de PCR.

### 5.6.3 PCR

Na realização da PCR foram usados vários iniciadores. Para o par de iniciadores 150/152 (Anexo A) direcionado para amplificação da região conservada dos minicírculos de kDNA do gênero *Leishmania* (DEGRAVE et al., 1994; PASSOS et al., 1996) produzindo fragmento de 120pb em *L. (V.) braziliensis* e 116 pb em *L. (L.) amazonensis*, as condições de realização da PCR foram aquelas descritas pelos autores Degrave et al. 1994 e Passos et al. 1996. Foi utilizado o par de iniciadores 13Y/13Z (Anexo A) direcionado para amplificação da região não conservada do minicírculo de kDNA (RODGERS et al., 1990), produzindo fragmentos em torno de 650pb em *L.(V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. As condições para esta reação foram: tampão de reação 10% do volume final (20  $\mu$ L), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de dNTP, 40 pmoL dos iniciadores e 0,5 unidades de *Taq platinum*. Cada reação foi realizada com temperatura de desnaturação de 94°C, anelamento 57°C e extensão 72°C, totalizando 35 ciclos. As reações de PCR foram realizadas no Termociclador GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, USA).

### 5.6.4 RFLP

A análise do kDNA por enzima de restrição realizou-se conforme descrita por Volpini et al. (2004). Para analisar a seqüência de kDNA dos isolados de *Leishmania* dos pacientes de ambas regiões endêmicas, foi feita digestão com a enzima de restrição HaeIII, conforme orientação do fabricante.

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular de Microorganismos da UNIFAL – MG.

### 5.6.5 Análise dos produtos de PCR e RFLP

Os produtos de PCR e RFLP foram visualizados em gel de agarose (confeção do gel citada no item 5.6.2) e de poliacrilamida, conforme descrito por Marques et al. (2001).

### 5.6.6 Controles

Controles negativos e positivos da PCR foram incluídos em cada conjunto de reação. O controle positivo teve 0,01 a 1,0 pg de DNA padrão de *Leishmania*. Estes DNAs foram obtidos de cepas referência de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903 e *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/73/M2269. Estas cepas foram obtidas do criobanco do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP e mantidas no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da Universidade de Alfenas (UNIFENAS). Os DNAs padrões de *Leishmania* foram obtidos de promastigotas das cepas referências cultivadas em meio NNN/Schneider, coletadas em fase exponencial ( $10^6$ ) de crescimento. Para excluir as possibilidades de reações cruzadas foram usadas amostras de fragmentos de pele de pacientes sem dermatoses e/ou com outras dermatoses que não LTA.

Como controle negativo da reação foi usado um tubo que continha todos os componentes, exceto DNA. A revelação do produto amplificado para diagnóstico foi feita conforme descrição de Marques et al. (2001). Para descartar possíveis falhas da PCR na detecção de DNA de *Leishmania* foram feitos testes de inibição nas amostras que tiveram resultado negativo. No mesmo tubo de reação foi adicionado 1  $\mu$ L da preparação de DNA da amostra negativa a 1/10 e 1  $\mu$ L de DNA padrão de *Leishmania* a 10 fg/ $\mu$ L.

### 5.7 Tratamento

Após os exames de rotina, os pacientes com lesão característica, TM e/ou parasitológico positivos, foram submetidos a antimonioterapia. No VRD os pacientes foram tratados com antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®-Aventis), na dose de 17mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia via intramuscular profunda, com intervalo de 10 dias para cada série, até a completa cicatrização. A conclusão do tratamento se deu após a completa cicatrização das lesões, as quais não apresentavam sinais de atividade, como infiltrados e eritemas. Após um mês da completa cicatrização, os pacientes foram reavaliados quanto à cura clínica e alertados sobre os riscos de recidivas e principalmente, a ocorrência de lesões mucosas (MARZOCHI, 1992).

Todavia os pacientes atendidos pelo Sistema de Saúde Pública na região SSMG sob os cuidados das Gerências Regionais de Saúde de Alfenas, Passos, Pouso Alegre e Varginha foram tratados conforme esquema preconizado pelo Ministério da Saúde. Assim sendo, na

forma cutânea localizada a dose empregada foi de 15mg Sb<sup>V</sup>/Kg/dia, tanto em adultos quanto em crianças, durante 20 dias seguidos. Nos casos onde não houve cicatrização completa após três meses do término do tratamento, o esquema foi repetido, prolongando-se, desta vez, a duração da série para 30 dias.

Em caso de não resposta, utilizou-se uma das drogas de segunda escolha (anfotericina B, pentamidina ou a imunoterapia).

Adicionalmente, em 10 pacientes pós-tratamento, sendo 9 do VRD e 1 do SSMG, foi realizada a coleta de sangue periférico com posterior confecção de esfregaço sangüíneo (corado com Giemsa) para pesquisa parasitológica de amastigotas. A partir destes esfregaços, realizou-se extração de DNA para reação de PCR, com intuito de detectar ou não a presença de *Leishmania* no paciente. Previamente à reação de PCR, foi realizado o teste de inibição como controle, conforme item 5.6.6.

## 5.8 Análise dos resultados

Os cálculos e as análises foram feitos empregando-se os softwares; MEDCALC; MICROSOFT EXCEL. As fotos dos géis foram feitas pelo sistema digital Kodak (modelo EDAS-290). Os dados clínicos e epidemiológicos foram comparados com os laboratoriais pelo teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), sendo considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ . Cada fragmento de kDNA que sofreu digestão pela enzima de restrição HaeIII, contribuiu para um padrão, que foi interpretado pela ausência ou presença de bandas. A relativa posição de cada banda foi comparada com todas as outras de cada isolado de paciente e de cepas padrão de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.

As análises da sensibilidade, da especificidade e da concordância (kappa) foram usadas para a avaliação do diagnóstico da LTA por PCR, em relação ao exame microscópico e ao TM. Por sua vez todas as correlações dos dados clínicos e laboratoriais foram avaliadas a partir do índice de Pearson.

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 Dados epidemiológicos**

#### **6.1.1 Número de casos**

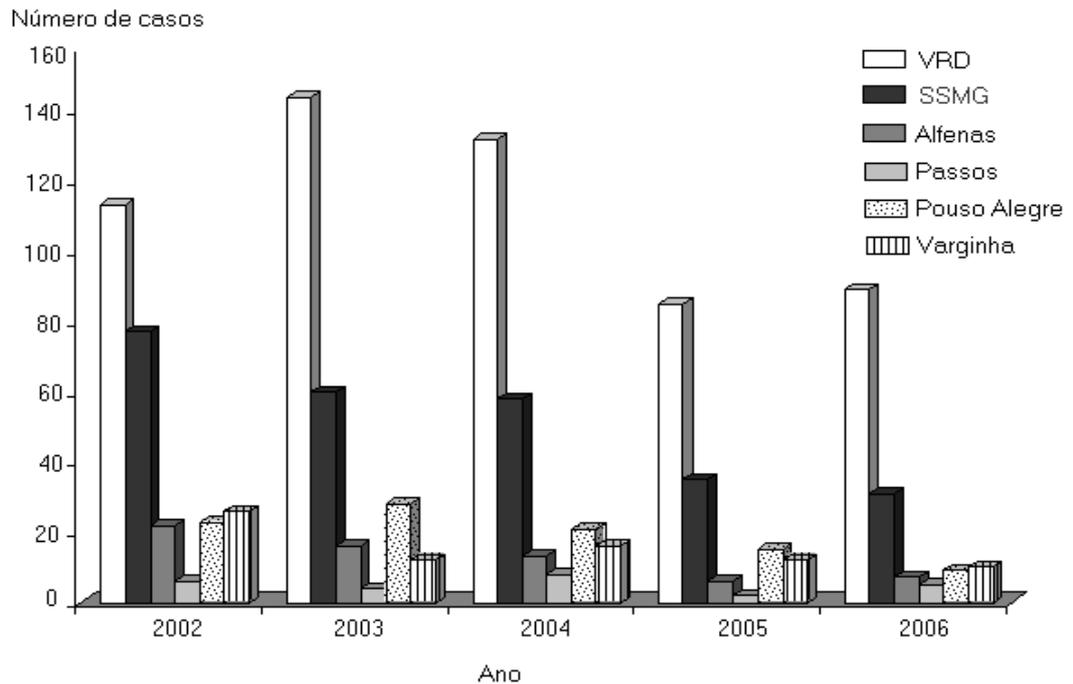
Dos 824 pacientes com LTA analisados no levantamento epidemiológico, 261 (31,7%) eram da região SSMG e 563 (68,3%) do VRD. Os resultados apresentaram alta significância ( $p < 0,0001$ ).

##### **6.1.1.1 Sul e Sudoeste de Minas Gerais**

O número de casos de LTA notificados nas GRS de Alfenas, Passos, Pouso Alegre e Varginha, foi observada uma diminuição de 59,7% no período de 2002 a 2006 (Figura 4). Dentre as regiões estudadas, a de Alfenas representou 24,5; Passos 9,6; Pouso Alegre 36,8 e Varginha 29,1% dos casos. A forma clínica mais comumente encontrada foi a do tipo cutânea com 91,9; seguida da mucocutânea com 7,7 e 0,4% dos casos foi ignorada.

##### **6.1.1.2 Vale do Rio Doce**

Em relação aos casos ocorridos no ambulatório de Leishmanioses “Dr. Paulo Araújo Magalhães” de Caratinga, se observou uma diminuição no decorrer dos anos, de até 25,7% entre 2002 a 2005 (Figura 4). Em 2006 o número de casos foi semelhante a 2005. No período, o ano de 2002 representa 20,1% dos casos, enquanto que em 2003 (25,6%), 2004 (23,4%), 2005 (15,1%) e 2006 (15,8%). Em relação à forma clínica, a predominante foi a cutânea com 93,6 seguida pela mucocutânea 5,2 e mucosa 1,2%.



Fonte: Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) e Ambulatório de Leishmanioses “Dr. Paulo Araújo Magalhães” de Caratinga, período de 2002 a 2006. ( $p < 0,0001$ )

Figura 4 - Número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos nas Gerências Regionais de Saúde de Alfenas, Passos, Pouso Alegre e Varginha (SSMG) e na região do Vale do Rio Doce (VRD).

## 6.1.2 Características gerais dos pacientes

### 6.1.2.1 Sul e Sudoeste de Minas Gerais

No SSMG os pacientes do sexo masculino representaram a maioria dos casos notificados com 64,4% e a raça/cor com maior expressão foi branca, totalizando 78,5% dos casos. Por sua vez a faixa etária de 21 a 50 anos foi a mais atingida com 55,2% e a de 6 a 10 anos, a menos atingida com 3,8% dos casos. Foi também avaliada a escolaridade dos portadores de LTA, sendo que os pacientes com 1 a 3 e de 4 a 7 anos de estudo foram os mais atingidos, correspondendo a 28,0 e 26,4%, respectivamente, enquanto que os com 12 ou mais anos de estudo tiveram 5,7% (Tabela 1). A ocorrência dos casos foi maior naqueles que possuíam residência em zona urbana com 51,7; seguida pela rural com 38,7 e em ambas 1,5%; enquanto que em 8,0% dos casos este item foi ignorado.

Tabela 1 - Características gerais dos pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana das regiões sul, sudoeste e Vale do Rio Doce, estado de Minas Gerais, no período de 2002 a 2006.

Paciente	Número de casos		Porcentagem (%)	
	SSMG	VRD	SSMG	VRD
<b>Idade (anos)*</b>				
0 a 5	13	30	5,0	5,3
6 a 10	10	27	3,8	4,8
11 a 20	25	103	9,6	18,3
21 a 50	144	272	55,2	48,3
51 ou mais	65	131	24,9	23,3
Ignorado	4	-	1,5	-
Total	261	563	100,0	100,0
<b>Raça/Cor*</b>	<b>SSMG</b>	<b>VRD</b>	<b>SSMG</b>	<b>VRD</b>
Branca	205	335	78,5	59,5
Preta	26	37	10,0	6,6
Parda	22	191	8,4	33,9
Amarela	3	-	1,1	-
Indígena	1	-	0,4	-
Ignorado	4	-	1,6	-
Total	261	563	100,0	100,0
<b>Escolaridade**</b>	<b>SSMG</b>	<b>VRD</b>	<b>SSMG</b>	<b>VRD</b>
Nenhuma	19	-	7,3	-
1 a 3 anos	73	-	28,0	-
4 a 7 anos	69	-	26,4	-
8 a 11 anos	38	-	14,6	-
12 ou mais	15	-	5,7	-
Ignorado	41	-	15,7	-
Não se aplica	6	-	2,3	-
Total	261		100,0	

Fonte: Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) e Ambulatório de Leishmanioses “Dr. Paulo Araújo Magalhães” de Caratinga; SSMG: Sul e Sudoeste de Minas Gerais; VRD: Vale do Rio Doce; - sem dado.

\* $p < 0,0001$ ; \*\* o item escolaridade não foi registrado no ambulatório de Leishmanioses “Dr. Paulo Araújo Magalhães” de Caratinga.

### 6.1.2.2 Vale do Rio Doce

No VRD os pacientes do sexo masculino representaram 61,3% dos casos notificados e a raça/cor branca totalizou 59,5%. Ainda vale ressaltar que 33,9% dos pacientes notificados são da raça/cor parda. A faixa etária de 21 a 50 anos correspondeu a 48,3% dos casos e a de 6 a 10 anos, a menos atingida com 4,8% (Tabela 1). Ainda, a maioria dos casos foi em



Trabalhador da agricultura	07	10,9	01	4,0	07	7,3	07	9,2	22	8,4	24	43,2
											3	
Aposentado	06	9,4	-	-	06	6,3	04	5,3	16	6,1	68	12,0
Estudante	05	7,8	-	-	06	6,3	07	9,2	18	6,9	10	17,9
											1	
Outros	07	11,0	02	8,0	11	11,4	02	2,6	22	8,4	39	6,9
Ignorado	15	23,4	22	88,0	50	52,0	52	68,4	139	53,4	02	0,5
<b>Total</b>	<b>64</b>	<b>100,0</b>	<b>25</b>	<b>100,</b>	<b>96</b>	<b>100,0</b>	<b>76</b>	<b>100,0</b>	<b>261</b>	<b>100,0</b>	<b>56</b>	<b>100,</b>
				<b>0</b>							<b>3</b>	<b>0</b>

Fonte: Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), Ambulatório de Leishmanioses “Dr. Paulo Araújo Magalhães” de Caratinga; SSMG: Sul e Sudoeste de Minas Gerais; VRD: Vale do Rio Doce; n: número de casos; (%): percentual; -: sem dado; outros: advogado, comerciante, contador, eletricista, forneiro, motorista, pedreiro, pintor, professor, sem ocupação. \* $p < 0,0001$

#### 6.1.4 Diagnóstico no levantamento epidemiológico

##### 6.1.4.1 Sul e Sudoeste de Minas Gerais

O diagnóstico dos casos de LTA nas GRS analisadas foi baseado no TM, nos exames parasitológico e histopatológico, além do clínico-epidemiológico. Houve positividade em 55,6; 10,7 e 19,5% dos casos de LTA no TM, nos exames parasitológico e histopatológico, respectivamente, contudo, não foram realizados o TM, exames parasitológico e histopatológico em 25,3; 73,6 e 51,3% dos casos respectivamente (Tabela 3).

Os critérios para confirmação dos casos foram baseados na sua maioria pelos exames laboratoriais (85,0%), seguido pelo clínico-epidemiológico (14,2%) e ignorados (0,8%). A maioria dos casos de LTA era de novos com 92,3%; enquanto que 7,3% era recidiva e apenas 0,4% dos casos foi ignorado ( $p < 0,0001$ ).

##### 6.1.4.2 Vale do Rio Doce

No VRD houve positividade para os casos de LTA nos exames de TM (84,0%), exames parasitológicos (73,0%) e histopatológico (1,1%). Em 5,2% dos pacientes o exame parasitológico não foi realizado, enquanto que o exame histopatológico não foi aplicado em 98,5% dos casos e o TM foi aplicado em todos os casos (Tabela 3).

Os critérios para confirmação foram baseados em 98,0% nos exames laboratoriais e 2,0% nos aspectos clínico-epidemiológicos. A maioria dos casos de LTA era de novos 99,1%; enquanto que 0,9% era recidiva ( $p < 0,0001$ ).

Tabela 3 - Exames realizados no diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana nas regiões sul, sudoeste e Vale do Rio Doce, estado de Minas Gerais, no período de 2002 a 2006.

Exames*	Número de casos		Porcentagem (%)	
	SSMG	VRD	SSMG	VRD
<b>Teste de Montenegro</b>				
Positivo	145	473	55,6	84,0
Negativo	35	90	13,4	16,0
Não realizado	66	-	25,3	-
Ignorado	15	-	5,7	-
Total	261	563	100,0	100,0
<b>Exame Parasitológico</b>				
Positivo	28	411	10,7	73,0
Negativo	22	123	8,4	21,8
Não realizado	192	29	73,6	5,2
Ignorado	19	-	7,3	-
Total	261	563	100,0	100,0

<b>Exame Histopatológico</b>	<b>SSMG</b>	<b>VRD</b>	<b>SSMG</b>	<b>VRD</b>
Compatível	50	-	19,2	-
Encontro do parasita	51	6	19,5	1,1
Não compatível	15	2	5,8	0,4
Não realizado	134	555	51,3	98,5
Ignorado	11	-	4,2	-
<b>Total</b>	<b>261</b>	<b>563</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>

Fonte: Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) e Ambulatório de Leishmanioses “Dr. Paulo Araújo Magalhães” de Caratinga; SSMG: Sul e Sudoeste de Minas Gerais; VRD: Vale do Rio Doce; - sem dado \* $p < 0,0001$ .

## 6.1.5 Tratamento

### 6.1.5.1 Sul e Sudoeste de Minas Gerais

Após confirmação dos casos de LTA, os pacientes foram submetidos ao tratamento. Na terapêutica inicial o antimônio pentavalente ( $Sb^V$ ) foi empregado em 84,0% dos pacientes; anfotericina em 1,9% e pentamidina em 1,1%. Em 6,8% dos pacientes este dado foi ignorado. A dose usada no tratamento com  $Sb^V$  variou de  $<10$  mg  $Sb^V/Kg/dia$  a  $>20$  mg  $Sb^V/Kg/dia$  (Tabela 4) por 20 dias seguidos de medicação. A dose de 10 a 15 mg  $Sb^V/Kg/dia$  e de 15 mg  $Sb^V/Kg/dia$  foram as mais utilizadas com 24,1% cada. Todavia, em 28,0% dos casos este item foi ignorado.

Dos pacientes confirmados para LTA, 3,1% dos casos não foram tratados inicialmente por algum motivo que os impediram de receber a medicação, e 5,4% não responderam ao tratamento inicial com antimonial. Naqueles pacientes onde houve falência no tratamento inicial, o  $Sb^V$  foi empregado em 12,0% dos casos. Vale ressaltar que de acordo com as fichas, os itens ignorado (28,6%) e “não se aplica” (52,5%) chega a 81,1%.

### 6.1.5.2 Vale do Rio Doce

No VRD o  $Sb^V$  foi empregado em 96,9% dos pacientes e 3,1% foi tratado com a vacina Leishvacin® (Biobrás). A dose usada no tratamento com  $Sb^V$  variou de  $<10$  mg  $Sb^V/Kg/dia$  a  $>20$  mg  $Sb^V/Kg/dia$  (Tabela 4). A dose  $<10$  mg  $Sb^V/Kg/dia$  foi a mais utilizada, totalizando 40,3% dos casos.

Tabela 4 - Dose de antimônio pentavalente ( $Sb^V$ ) empregada em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana nas regiões sul, sudoeste e Vale do Rio Doce, estado de Minas Gerais, no período de 2002 a 2006.

Tratamento* dose (mg $Sb^V$ /Kg/dia)	Número de casos		Porcentagem (%)	
	SSMG	VRD	SSMG	VRD
<10	17	227	6,5	40,3
10-15	63	222	24,1	39,4
15	63	-	24,1	-
15-20	22	-	8,5	-
20	15	-	5,7	-
>20	08	114	3,1	20,3
Ignorado	73	-	28,0	-
Total	261	563	100,0	100,0

Fonte: Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) e Ambulatório de Leishmanioses “Dr. Paulo Araújo Magalhães” de Caratinga; SSMG: Sul e Sudoeste de Minas Gerais; VRD: Vale do Rio Doce; - sem dado. \* $p < 0,0001$

O número de ciclos no tratamento variou: 1-2 (7,5%), 3-4 (45,3%), 5-6 (20,1%), >6 (5,1%) (Tabela 5), e 124 pacientes (22,0%) não concluíram o tratamento, de modo que não se tem o número exato de ciclos empregados. Cada ciclo utilizado no VRD corresponde a 20 dias, sendo 10 de tratamento e 10 sem medicação até a cicatrização completa da lesão.

Tabela 5 – Número de ciclos de tratamento utilizados na região do Vale do Rio Doce, estado de Minas Gerais, no período de 2002 a 2006.

Ciclos de tratamento*	Pacientes	
	Número de casos	Porcentagem (%)
1 a 2	42	7,5
3 a 4	255	45,3
5 a 6	113	20,1
> 6	29	5,1
Indefinido	124	22,0
Total	563	100,0

Fonte: Ambulatório de Leishmanioses “Dr. Paulo Araújo Magalhães” de Caratinga.

\* $p < 0,0001$

### **6.1.6 Evolução da doença**

Após o tratamento da LTA, os pacientes foram acompanhados e a evolução da doença analisada.

#### **6.1.6.1 Sul e Sudoeste de Minas Gerais**

Foi observado que nas quatro gerências o percentual mais expressivo foi o de alta por cura, que chegou a 71,8% em Alfenas, 92,0% em Passos, 84,4% em Pouso Alegre e 89,6% em Varginha. Somando-se os demais itens nas 4 GRS, o item abandono chega a 12,6%, óbito 8,2% e recidiva sem registro.

#### **6.1.6.2 Vale do Rio Doce**

Dos pacientes analisados, 78,0% tiveram alta por cura, 16,7% ainda não concluíram o tratamento, uma vez que em alguns casos o número de ciclos e até mesmo o acompanhamento para se chegar ao critério de cura é demorado. Houve abandono em 4,4% dos casos, óbito em 0,7% e recidiva em 0,2%.

### **6.2 Análise diagnóstica e prognóstica da casuística**

Material biológico dos 39 pacientes com lesões compatíveis para LTA, sendo 10 de biópsias e/ou 29 de aposição de biópsias em lâminas, foram submetidos à análise molecular, exames parasitológico e histopatológico. Além destes, os pacientes foram submetidos ao TM. Dos 39 pacientes, 32 foram confirmados como portadores de LTA por pelo menos um dos exames realizados.

A positividade geral nos exames parasitológico e TM foi de 56,4 e 71,8% respectivamente. Já nos pacientes confirmados para LTA a positividade geral foi de 68,8 e 84,4% para os exames parasitológico e TM respectivamente (Tabela 6). O percentual de positividade geral do TM nos pacientes confirmados da casuística foi diferente em relação ao do levantamento epidemiológico do SSMG (55,6%), enquanto que os da região do VRD foi semelhante. No exame histopatológico a positividade geral e para pacientes confirmados, restringi-se a pacientes do SSMG. Vale destacar a maior positividade do exame parasitológico no VRD.

Tabela 6: Positividade nos exames parasitológico, histopatológico e teste de Montenegro (TM) nos pacientes da casuística, provenientes das regiões sul, sudoeste e Vale do Rio Doce, estado de Minas Gerais, no período de 2002 a 2006.

Exames*	Positividade – Pacientes confirmados para LTA (n=32)				
	SSMG (n=9)		VRD (n=23)		Geral (n=32)
	n	(%)	n	(%)	(%)
TM	06	66,7	21	91,3	84,4
Parasitológico	02	22,2	20	87,0	68,8
Histopatológico**	04	44,4	nr	nr	***

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana; SSMG: Sul e Sudoeste de Minas Gerais; VRD: Vale do Rio Doce; n: número de pacientes; nr: não realizado; \* $p < 0,0001$ . \*\* a partir de 13 amostras de pacientes sugestivos para LTA do SSMG, sendo 7 confirmados como portadores de LTA, \*\*\* positividade histopatológica restrita ao SSMG.

A extração de DNA do material de culturas de *Leishmania* com o kit Wizard e/ou com a técnica do fenol-clorofórmio foi satisfatória quanto a quantidade e qualidade. Em relação à extração de DNA a partir de aposição de lâminas e biópsias, com emprego de proteinase k e aquecimento, se observou um baixo rendimento e presença de degradação de DNA, conforme visualizado no arraste em gel de agarose (Figura 5).

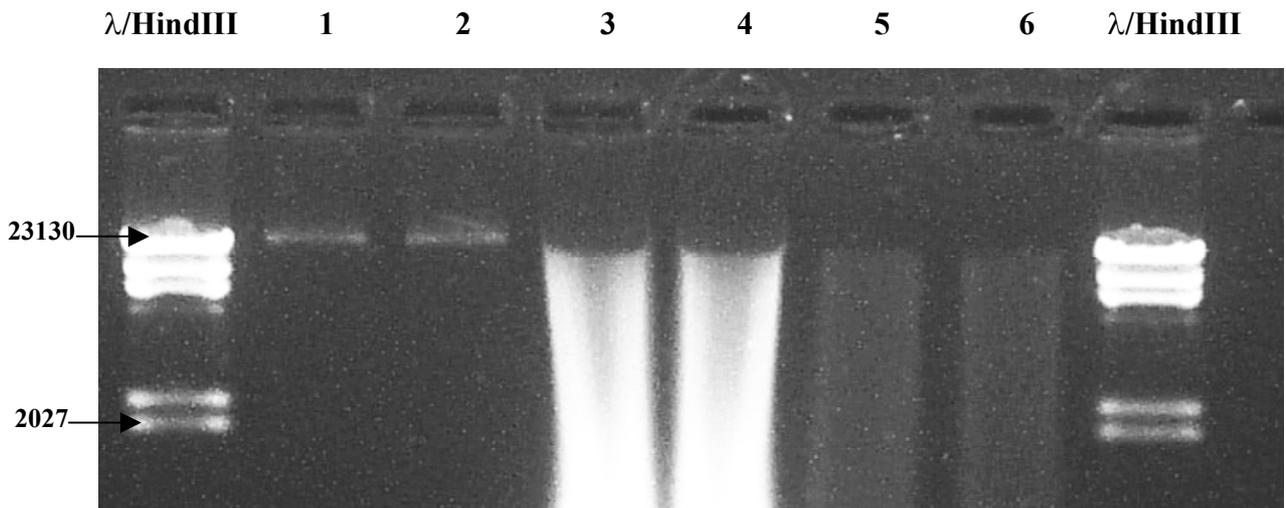


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 0,8% de extração de DNA.  $\lambda$ /HindIII: marcador molecular, 1 e 2: DNA genômico (diluição 1/100) extraído de cultura padrão de *Leishmania (V.) braziliensis* – M2903 pelo kit Wizard<sup>®</sup> Promega e pela técnica do fenol-clorofórmio, respectivamente, 3 e 4: DNA genômico extraído de biópsia de lesão de paciente com leishmaniose tegumentar americana (LTA) pela técnica da proteinase K, 5 e 6: DNA genômico extraído de aposição de biópsia de lesão de paciente com LTA em lâmina, pela técnica de aquecimento.

Os iniciadores 150/152 amplificaram fragmentos de 120 pb, como esperado, em 76,9% das amostras sugestivas para LTA, bem como na cepa padrão de *L. (V.) braziliensis*. Na cepa de *L. (L.) amazonensis* o produto amplificado foi de 116pb; o qual não foi possível diferenciar em relação ao produto de *L. (V.) braziliensis* em gel de agarose 1,5%, (Figura 6A e 6B).

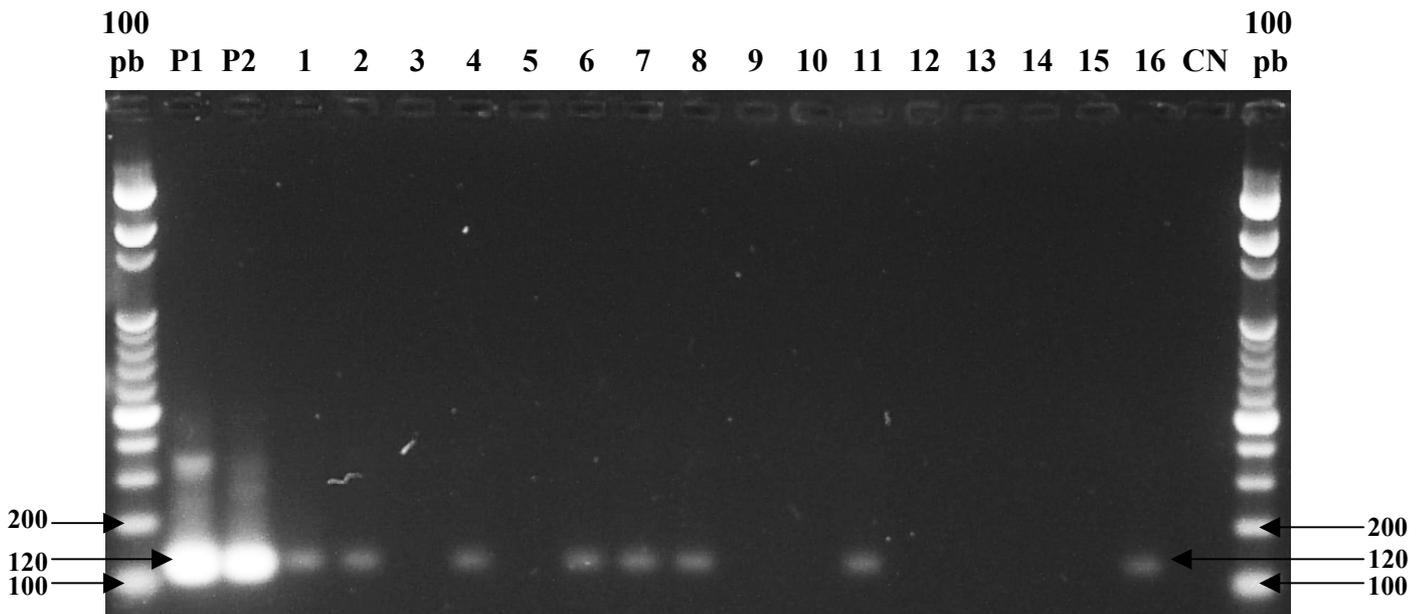


Figura 6A: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR com os iniciadores 150/152, com amostras de DNA de pacientes do Sul e Sudoeste de Minas Gerais (SSMG). 100pb: Marcador Molecular (Amresco); P1: cepa de referência de *L. (L.) amazonensis* – M2269; P2: cepa de referência de *L. (V.) braziliensis* – M2903; 1 a 16 amostras de pacientes do SSMG; CN: controle negativo. Amostras positivas: 1, 2, 4, 6, 7, 8, 11 e 16; amostras negativas: 3, 5, 9, 10, 12, 13, 14 e 15.

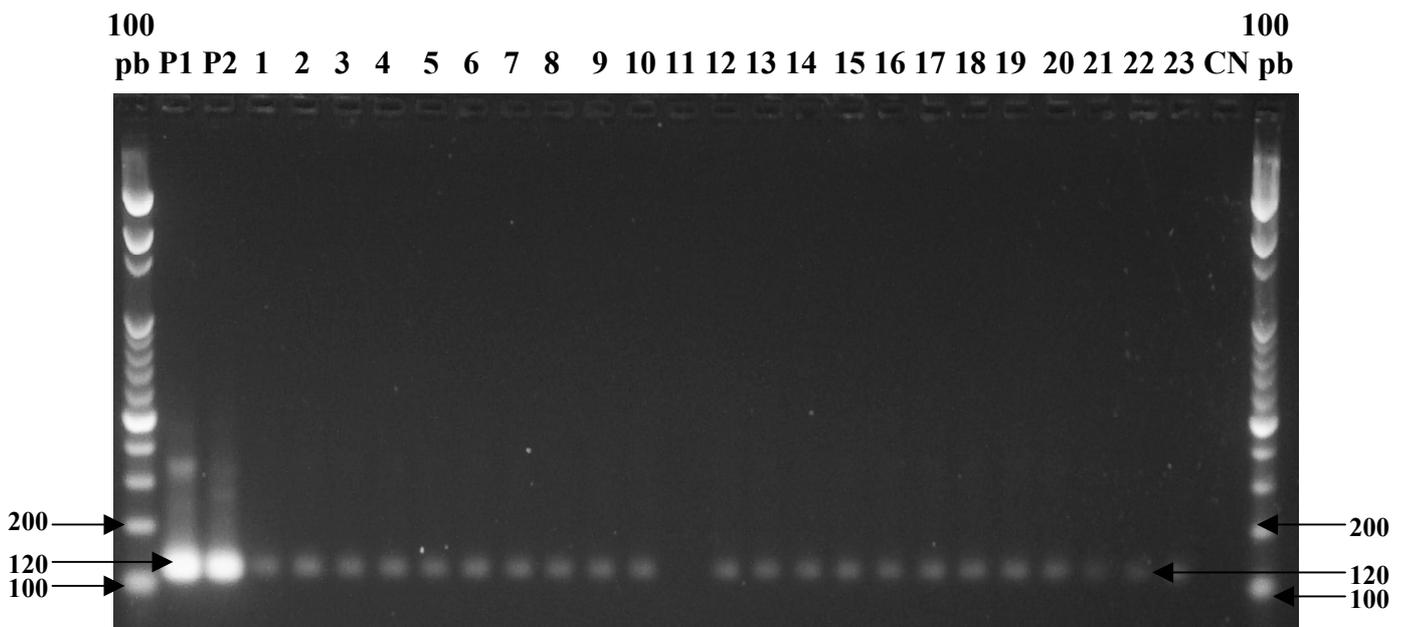


Figura 6B: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR com os iniciadores 150/152, com amostras de DNA de pacientes do Vale do Rio Doce (VRD). 100pb: Marcador Molecular (Amresco); P1: cepa de referência de *L. (L.) amazonensis* – M2269; P2: cepa de

referência de *L. (V.) braziliensis* – M2903; 1 a 23 amostras de pacientes do VRD; CN: controle negativo. Amostras positivas: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23; amostra negativa: 11.

Estes mesmos fragmentos de 120pb foram submetidos à digestão com a enzima de restrição HaeIII, gerando bandas de 40 e 80 pb, enquanto que o fragmento gerado com a cepa de *L. (L.) amazonensis* (116 pb), não foi digerido conforme visualizado em gel de poliacrilamida 10,0%. A figura 7 representa a amplificação dos fragmentos gerados pelos iniciadores 150/152 e seu produto de digestão enzimática. Por comparação dos padrões de restrição, todos os isolados analisados apresentaram perfil semelhante ao de *L. (V.) braziliensis*.

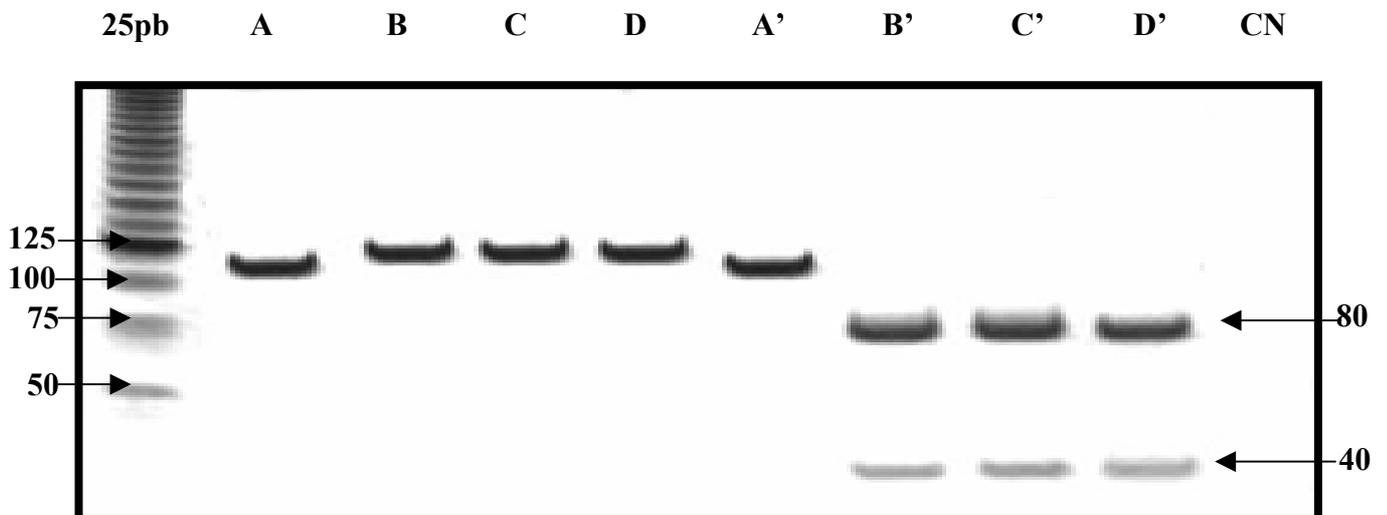


Figura 7: Eletroforese em gel de poliacrilamida 10,0% dos produtos de PCR e RFLP obtidos com iniciadores específicos para a região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania* a partir de amostras de DNA. 25pb: Marcador Molecular (Amresco); A: cepa de referência de *L.(L.) amazonensis* - M2269; B: cepa de referência de *L.(V.) braziliensis* - M2903; C: amostra de DNA de paciente do Vale do Rio Doce; e D: amostra de DNA de paciente do Sul e Sudoeste de Minas Gerais. A-D: produtos de PCR; A'- D': amostras restringidas com HaeIII; CN: Controle negativo.

Nas biópsias, a positividade da reação de PCR com o emprego dos iniciadores 150/152 foi de 80,0% para amostras sugestivas e 100,0% para pacientes confirmados para LTA. Já nas lâminas, a positividade foi de 75,9% para amostras sugestivas e 91,7% para amostras de pacientes confirmados para LTA. A positividade apresentada pelos iniciadores 150/152 no geral para amostras sugestivas foi de 76,9%, enquanto que nas confirmadas para LTA de 93,7% (Tabela 7). Ainda com os iniciadores 150/152, DNA de 10 lâminas de esfregaço sanguíneo pós-tratamento foi empregado em PCR e somente 1 foi positiva. Para realização desta PCR foi realizado previamente o teste de inibição (Figura 8).

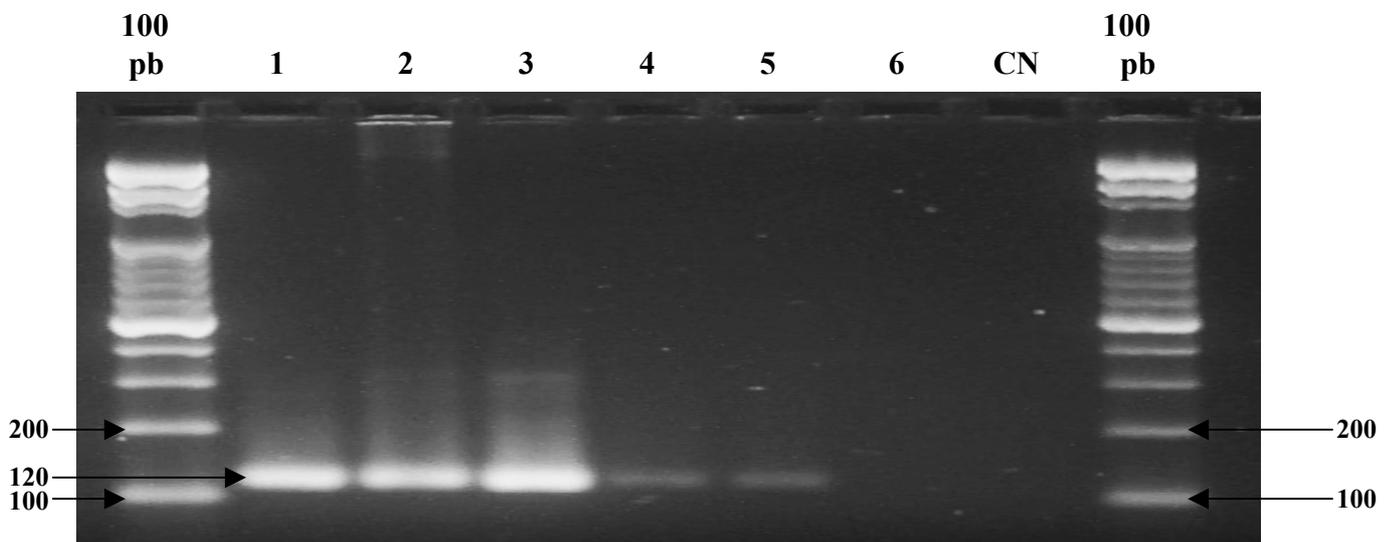


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR com os iniciadores 150/152 para o teste de inibição. 100pb: Marcador Molecular (Amresco), 1: amostra de DNA total da cepa de *L.(V.) braziliensis* – M2903; 2: amostra de DNA total da cepa M2903 diluída 1/10; 3 e 4: amostras de DNA a partir de lâminas com sangue, positivas para PCR (150/152) com e sem DNA exógeno de M2903 respectivamente; 5 e 6: amostras de DNA a partir de lâminas com sangue, negativa para PCR (150/152) com e sem DNA exógeno de M2903 respectivamente; CN: controle negativo.

Os iniciadores 13Y/13Z amplificaram fragmentos em torno de 650 pb, como esperado, em grande parte das amostras analisadas (Figura 9A e 9B), bem como fragmentos inespecíficos. Nas biópsias de pacientes sugestivos a positividade foi de 40,0% e em amostras de pacientes confirmados 50,0%. Em relação às lâminas, para pacientes sugestivos e confirmados a positividade foi de 62,1 e 75,0% respectivamente. A positividade apresentada

pelos iniciadores 13Y/13Z no geral para amostras sugestivas foi de 56,4%, enquanto que para aquelas confirmadas para LTA de 68,7% (Tabela 7).

Tabela 7: Positividade com os iniciadores 150/152 e 13Y/13Z nas 39 amostras de DNA de pacientes da casuística, provenientes das Gerências Regionais de Saúde de Alfenas, Passos, Pouso Alegre e Varginha e da região do Vale do Rio Doce, no período de 2002 a 2006.

Iniciadores	Positividade* - Pacientes (%)					
	Pacientes compatíveis para LTA (n=39)			Pacientes confirmados para LTA (n=32)		
	Biópsias	Lâminas	Geral	Biópsias	Lâminas	Geral
150/152	80,0	75,9	76,9	100,0	91,7	93,7
13Y/13Z	40,0	62,1	56,4	50,0	75,0	68,7

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana; n: número de pacientes; (%): percentagem. \* $p < 0,0001$ .

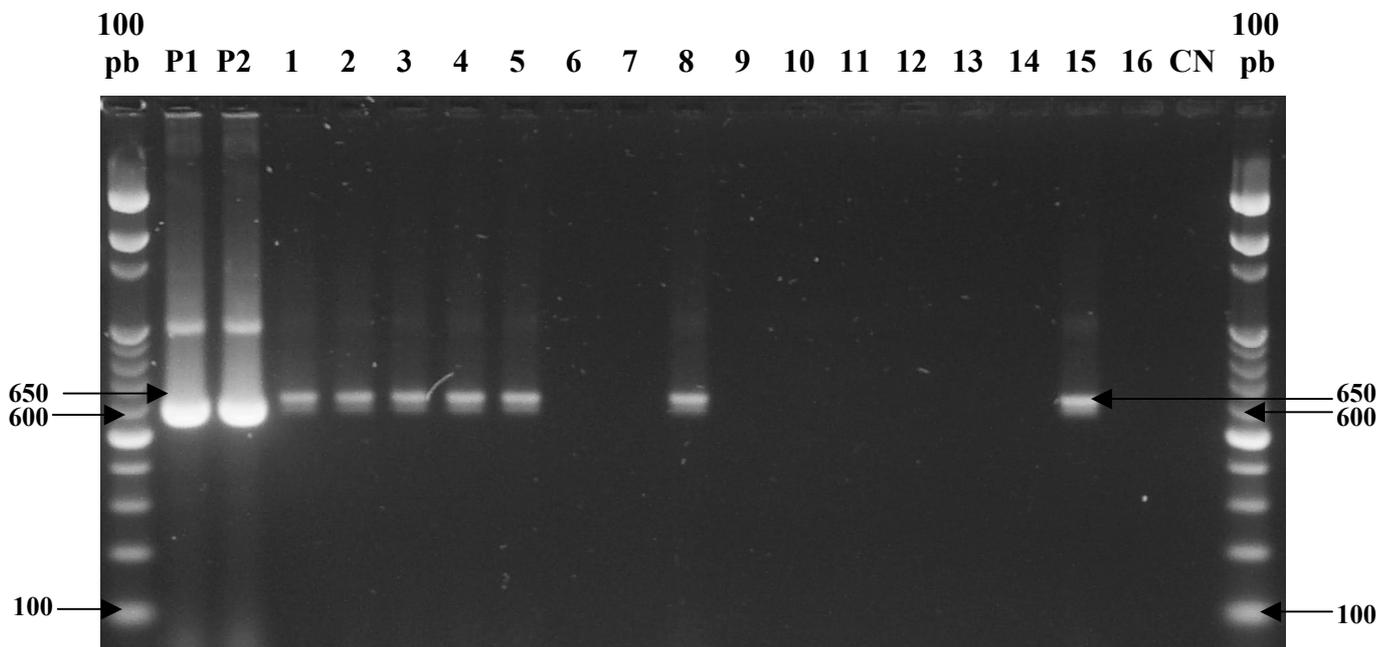


Figura 9A: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR com os iniciadores 13Y/13Z, com amostras de DNA de pacientes do Sul e Sudoeste de Minas Gerais (SSMG). 100pb: Marcador Molecular (Amresco); P1: cepa de referência de *L. (L.) amazonensis* – M2269; P2: cepa de referência de *L. (V.) braziliensis* – M2903; 1 a 16 amostras de pacientes

do SSMG; CN: controle negativo. Amostras positivas: 1, 2, 3, 4, 5, 8 e 15; amostras negativas: 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 16.

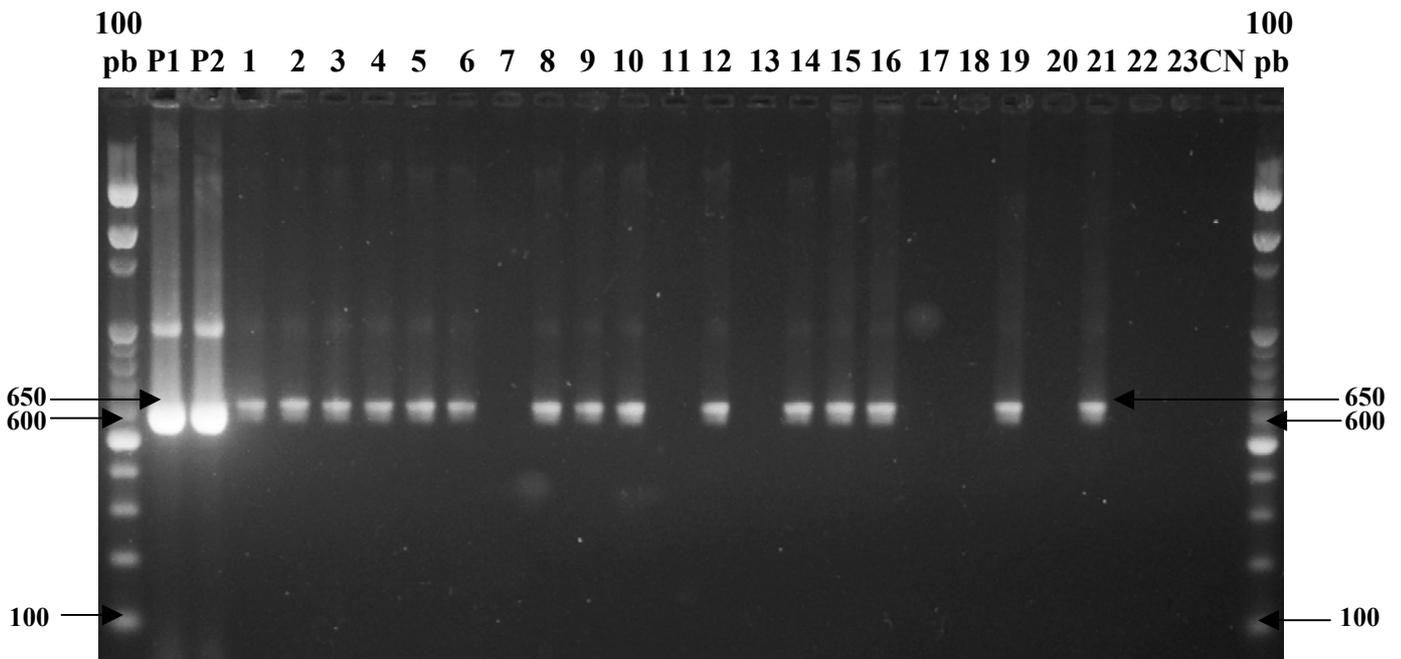


Figura 9B: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR com os iniciadores 13Y/13Z, com amostras de DNA de pacientes do Vale do Rio Doce (VRD). 100pb: Marcador Molecular (Amresco); P1: cepa de referência de *L. (L.) amazonensis* – M2269; P2: cepa de referência de *L. (V.) braziliensis* – M2903; 1 a 23 amostras de pacientes do VRD; CN: controle negativo. Amostras positivas: 1-6, 8-10, 12, 14-16, 19 e 21; amostras negativas: 7, 11, 13, 17, 18, 20, 22 e 23.

De um modo geral, o uso dos iniciadores 150/152 e 13Y/13Z propiciou um expressivo percentual de positividade nas reações de PCR na detecção de seqüências específicas do kDNA de *Leishmania*. Por comparação de proporções, a diferença do percentual de positividade entre os iniciadores não foi significativa no material proveniente de pacientes sugestivos para LTA, o que não ocorreu em pacientes confirmados.

O isolamento de *Leishmania* em meio NNN/Schneider, a partir das 39 amostras de pacientes, somente foi possível com 2 aspirados de lesão (5,1%), sendo um do SSMG e o outro do VRD.

Em relação ao tratamento, dos casos confirmados do SSMG (9) e do VRD (23), 3 do SSMG e 20 do VRD receberam alta, enquanto que 2 abandonaram (VRD) e 1 chegou a óbito, por motivos não relacionados à LTA (VRD). Os pacientes tratados não apresentaram recidiva até o momento e os demais estão em tratamento com compostos antimoniais.

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 Dados epidemiológicos

A LTA é considerada uma doença em expansão no Brasil e representa importante causa de morbidade para as populações residentes em áreas endêmicas (ANDRADE et al., 2005). O agente etiológico de maior prevalência é a *L. (V.) braziliensis* com distribuição geográfica em todas as regiões do país. No Brasil, a LTA tem crescido tanto em magnitude, como em expansão geográfica. Observa-se a coexistência de um duplo perfil epidemiológico, expresso pela manutenção de casos oriundos dos focos antigos ou de áreas próximas a eles e pelo aparecimento de surtos epidêmicos associados a fatores como o acelerado processo de expansão das fronteiras agrícolas, a implantação de áreas de garimpos, construção de estradas, entre outros (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). A epidemiologia da LTA apresenta características bastante diversas conforme a área geográfica, o que representa um desafio para os programas envolvidos com o diagnóstico, tratamento e controle da doença.

O Ministério da Saúde (2001) avaliou a distribuição espacial da LTA no Brasil, com identificação de 26 circuitos de importância epidemiológica, dos quais três se encontram em MG, entre eles estão a região do VRD, Vale do Jequitinhonha e a Região Metropolitana de Belo Horizonte. O SSMG não está incluído em nenhum destes circuitos, mas segundo Loiola (2003), foi constatado que algumas cidades da região apresentaram coeficientes de detecção de LTA acima de 15,0 casos/100 mil habitantes. Este dado demonstra uma alta incidência de casos em comparação com a média do Brasil, da região sudeste e em MG: 16,7; 3,9 e 9,0 casos/100 mil habitantes; respectivamente, nos anos de 2003 e 2004 (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O número de casos analisados nas regiões SSMG e no VRD, apresentou uma redução de 59,7 e de até 25,7% respectivamente no período de 2002 a 2006. No período de 2001 a 2005, no Brasil e na região Sudeste, o número de casos de LTA diminuiu, todavia em MG houve uma tendência de aumento em função do aparecimento de surtos, como o do Vale do Jequitinhonha (GONTIJO et al., 2002 e BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). É importante notar que a redução no número de casos no mesmo período no VRD foi menor que nas regiões sul e sudoeste do estado, principalmente por se tratar de uma região historicamente endêmica o que comporta um número maior de focos de transmissão.

No SSMG a principal atividade econômica é a agricultura. No turismo destaca-se o Circuito das Águas e o Lago de Furnas que banha 34 municípios. Estas características

geográficas e sócio-econômicas proporcionam a presença e o contato com o vetor da LTA. O aumento no número de casos ou sua redução está também ligado a fatores que favoreçam o vetor da *Leishmania*. No VRD a agricultura é uma das principais atividades econômicas além da mineração. As matas primárias nesta região foram substituídas por plantações, permanecendo apenas pequenos vales com vegetação nativa onde a contaminação ainda é grande. Em outras regiões do Brasil como a de Manaus, Boecken (1996), verificou que o número de casos de LTA tem correspondência direta com índices pluviométricos na região, por afetar a densidade dos vetores de *Leishmania*. Além deste fator, vale ressaltar o comprometimento dos serviços de saúde no diagnóstico da LTA por meio de exames laboratoriais, no sentido de diminuir o impacto de resultados falso negativos (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

A forma clínica cutânea foi a predominante nas regiões analisadas assim como em outros estudos realizados na Bahia (COSTA et al., 1998) e em São Paulo (ANDRADE et al., 2005). Vale ressaltar que esta forma clínica pode estar relacionada ao agente etiológico *L. (V.) braziliensis*, uma vez que a sintomatologia, além de fatores intrínsecos ao hospedeiro, está também ligada à espécie de *Leishmania* (CUPOLILLO et al., 2003). A forma cutânea pode evoluir para a mucocutânea após tratamento inicial, pelo uso de doses abaixo do recomendado, falência no tratamento e também pela demora na utilização de medicamentos (OLIVEIRA e MATOS, 2006). Estes fatos justificam a busca por um diagnóstico e tratamento mais rápidos e adequados. Na região do VRD foi também registrada uma importante forma da LTA a mucosa (1,2%), que pode ocasionar sérios comprometimentos ao paciente.

Em relação à distribuição de casos entre o sexo e faixa etária, o que se pode notar é que a faixa etária de 21 a 50 anos foi a mais atingida, visto que são indivíduos em fase produtiva e que são mais expostos ao vetor (GUERRA et al., 2006). O sexo masculino apresentou maior percentual de casos, justificado por seu maior contingente no trabalho fora do domicílio como pode ser notado por ocupações relacionadas à agricultura. Vale ainda destacar a grande parcela de trabalhadores na aqüicultura na GRS de Alfenas com LTA (23,4%), o que se justifica, por matas próximas a lagos e rios, o que aumenta a umidade e conseqüentemente as condições para o desenvolvimento dos vetores de *Leishmania*. Contudo, esta informação não reproduz o número de casos na zona rural, que é mais baixo, provavelmente por se tratar de trabalhadores que residem em área urbana na região SSMG. De fato, os registros da ocupação dos pacientes apontam para a possibilidade de transmissão

domiciliar e peridomiciliar, como pode ser exemplificado pelo percentual expressivo de ocupação “Do lar” nas regiões analisadas. Por sua vez, no VRD, a maior parcela de pacientes com LTA residem em zona rural (95,7%). Esta diferença provavelmente está relacionada à quantidade de focos endêmicos antigos nesta zona. Atualmente, tem-se observado uma mudança no padrão epidemiológico de transmissão da leishmaniose em diversos países, como Bolívia, Brasil, Peru e Venezuela, com uma importante domiciliação de vetores (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; BRANDÃO et al., 1999; CAMPBELL et al., 2001; DESJEUX, 2001; PASSOS et al., 2001). Adicionalmente, foi observado que o número de casos foi maior nos indivíduos com escolaridade baixa, 1 a 7 anos, em contraste com aqueles que possuem 12 ou mais anos de estudo (5,7%). Este dado mostra que a condição sócio-econômica gerada pela falta de estudo é um fator importante na contaminação dos indivíduos com o vetor, em função também de moradias mais próximas às periferias das grandes cidades. Isto explicaria a expressiva parcela de pacientes com LTA na zona urbana (51,7%) e não na urbana/rural e rural no SSMG. Estes dados de escolaridade não foram coletados na região do VRD o que contribuiu com a falta de informação ao nível sócio-epidemiológico.

Embora outras ocupações como a de estudante e aposentado apresentaram expressivo percentual de casos nas GRS de Alfenas, Passos, Pouso Alegre e Varginha a opção mais registrada é a de ignorado. Em Passos essa opção tem um percentual extremamente alto (88,0%); em Pouso Alegre 50,0% e em Varginha 67,1%; o que gera uma série de deficiências no processo investigativo, diferentemente do VRD, onde se observa o preenchimento deste item em todas as fichas. Há falhas na prestação de serviços no atendimento dos casos de LTA, como pode ser observado no preenchimento das fichas de notificação de agravos e nos problemas relacionados à digitação dos dados nas GRS. O conhecimento dos aspectos epidemiológicos é fundamental para a divulgação da situação da LTA nas regiões (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

A população com raça/cor branca foi a que mais contraiu casos de LTA. Segundo o censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (BRASIL/MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO, 2005), a maioria da população neste período, residente no sudeste se declarou branca, 62,4%. Vale destacar que no VRD a população declarada parda apresentou um alto percentual de LTA (33,9%). O termo “Raça” foi empregado na dissertação tendo como base a ficha de investigação do sistema de agravos de notificação (SINAN) de LTA, no item 13 “Raça/cor”, justamente por alguns dados empregados neste trabalho terem sido oriundos destas fichas. O termo raça não deve ser

utilizado, pois, pesquisas de variabilidade genética com diferentes marcadores em diversas populações apresentaram o mesmo perfil. O baixo grau de variabilidade genética e de estruturação da espécie humana é incompatível com a existência de raças como entidades biológicas e indica que considerações de cor e/ou ancestralidade geográfica pouco ou nada contribuem para a prática médica, especialmente no cuidado do paciente individual (PENNA, 2005).

## 7.2 Diagnóstico

O diagnóstico dos pacientes foi baseado nos resultados do TM, exame parasitológico, histopatológico e clínico-epidemiológico. O TM é de grande valor presuntivo no diagnóstico da LTA, constituindo valioso recurso nos casos em que os parasitas são escassos ou ausentes, sendo também bastante útil nos inquéritos epidemiológicos de áreas endêmicas (GONTIJO e CARVALHO, 2003). No presente trabalho a positividade do TM no SSMG e no VRD foi de 55,6 e 84,0%, respectivamente. CUBA-CUBA et al. (1984) mostraram que a positividade do TM pode alcançar 93,0% dos pacientes com lesões cutâneas. Todavia, no SSMG, 25,3% dos pacientes com LTA não realizaram o TM. A exequibilidade e os resultados obtidos pelo TM tem permitido o seu uso na rotina do imunodiagnóstico da LTA. Entretanto, este teste não é capaz de distinguir uma infecção ativa de uma não-ativa (WEIGLE et al., 1993). No VRD a positividade do teste parasitológico foi alta, entretanto no SSMG, 73,6% dos pacientes não foram submetidos a este teste. Vários fatores poderiam estar contribuindo para essa maior positividade no VRD, entre eles, os procedimentos de coleta e/ou confecção de lâminas para exame parasitológico, com maior número de lâminas confeccionadas por paciente (3), o que aumenta as chances de encontro do parasita e a coleta mais recente do material da lesão. Com o passar do tempo, as lesões tendem a ter menor densidade parasitária, o que leva à diminuição da sensibilidade no exame parasitológico. MARZOCHI (1992) relatou que a sensibilidade do exame parasitológico na LTA causada por espécies do complexo *L. braziliensis* está em torno de 100,0%, até 2 meses de infecção; diminuindo para 75,0% após 6 meses e para 20,0% nos casos com mais de 1 ano. PIRMEZ et al. (1999) observaram que os métodos convencionais de diagnóstico foram capazes de detectar o parasito, principalmente, em pacientes com lesões múltiplas e com tempo de evolução  $\leq 3$  meses. Neste trabalho, o isolamento de *Leishmania* a partir de aspirados de lesão, foi baixo (5,1%). As chances de isolamento são dificultadas principalmente por coletas de aspirado não recentes, em áreas da

lesão não adequadas, além da própria dificuldade de isolamento de *Leishmania braziliensis* (ANDRADE et al., 2005), o principal agente etiológico na região.

Na região do VRD, somente 5,2% dos pacientes não realizaram o teste parasitológico, já o histopatológico não foi empregado em 98,5 e 51,3% dos casos no VRD e SSMG, respectivamente. O alto percentual de pacientes sem exame histopatológico no VRD se deve também à necessidade de exames mais simples e rápidos como aqueles a partir de lâminas, uma vez que o histopatológico é mais demorado, o que inviabiliza seu uso nesta região (VRD). No exame parasitológico a positividade varia de 33,0 a 63,0% (DE-BRUJIN et al., 1993; RODRIGUEZ et al., 1994; PIRMEZ et al., 1999; AVILES et al., 1999), enquanto que no histopatológico a positividade varia entre 18,8 a 63,7% (FERNANDES et al., 2004); o que justifica o emprego destas técnicas no diagnóstico de LTA.

No SSMG o alto percentual de pacientes que não realizaram os exames parasitológico e histopatológico é preocupante. Os serviços de atendimento à LTA no SSMG necessitam de um centro de referência em diagnóstico da doença. Além disso, os métodos tradicionais de diagnóstico, mesmo quando usados em associação, não são capazes de diagnosticar todos os casos da doença (LOPEZ et al., 1993) e a não utilização dos mesmos pode gerar erro no diagnóstico conclusivo. Quanto à confirmação dos casos, a maioria foi através de exames laboratoriais, 85,1% no SSMG e 98,0% no VRD. Esta diferença em relação à confirmação dos casos nas duas regiões é significativa, principalmente no que se refere à dificuldade encontrada no diagnóstico conclusivo baseado apenas no clínico-epidemiológico, já que 14,8% dos casos no SSMG foram confirmados deste modo. Em uma região historicamente endêmica e ainda, sendo um centro de referência em tratamento de leishmanioses como é o caso da região do VRD, a confirmação é basicamente laboratorial, o que de certo modo reduz a obtenção de resultados falso positivos de LTA.

A maioria dos casos no SSMG estudados era de novos, enquanto que apenas 7,3% era recidiva. Também no VRD, 99,1% dos casos era de novos e 0,9% recidiva; o que pode ser explicado pelo tratamento empregado nesta região.

Em relação ao diagnóstico da LTA dos 39 pacientes da casuística, vários pontos podem ser destacados nos exames realizados. O TM alcançou alta positividade, tanto em pacientes sugestivos (71,8%) quanto confirmados (84,4%) para LTA nas duas regiões. Contudo estes percentuais de positividade não reproduziram os alcançados na região do SSMG no levantamento epidemiológico (55,6%), enquanto que no VRD os valores estão próximos (84,0%). Uma provável explicação para a falta de reprodutibilidade nos valores do

TM geral dos pacientes da casuística em relação aos do levantamento epidemiológico do SSMG está no alto percentual de pacientes que não realizaram o teste no levantamento epidemiológico (25,3%), além do item ignorado (5,7%), quando se considera o total da casuística analisada.

Adicionalmente, alguns pacientes confirmados para LTA tiveram seu TM negativo. Provavelmente esta negatividade se deve a uma possível queda da imunidade, seja pelo emprego de corticóides e/ou de origem natural, aplicação inadequada via intradérmica, o que pode dificultar a visualização da endureção de resposta, teste realizado entre o 1º e o 4º mês do início da lesão cutânea, além de problemas relacionados à leitura do teste (WHO, 1990). O exame parasitológico mostrou grande diferença de positividade entre as regiões do VRD e SSMG conforme discutido anteriormente. Outros fatores que poderiam ter levado a uma baixa positividade deste exame no SSMG estão na falta de técnicos especializados, coleta de material biológico inapropriada, além de um número menor de lâminas por paciente (2), o que diminui as chances de encontro do parasita. No exame histopatológico, o que foi fortemente verificado é a falta de sua realização nos pacientes do VRD, já discutida anteriormente. O que pode ser acrescentado, é que a positividade encontrada no SSMG poderia ser maior, com coletas em áreas da lesão mais prováveis de encontro do parasita e mais recentes, já que quanto maior é o tempo de evolução da lesão, menor é a possibilidade de encontrar o parasita (NOGUEIRA e SAMPAIO, 2001).

Embora não haja um único método que possa ser usado como padrão-ouro no diagnóstico da LTA, os resultados de validação da PCR encontrados na literatura são significativos. Quando comparada à microscopia direta, a PCR apresenta 100,0% de sensibilidade e especificidade (BELLI et al., 1998), sendo que sua positividade é de 96,9% em pacientes com lesões cutâneas e portadores de LTA, entretanto os métodos convencionais de detecção do parasito apresentam 67,4% de positividade (PIRMEZ et al., 1999). A PCR associada a outros métodos de diagnóstico para LTA, aumenta a precisão no diagnóstico conclusivo, conforme verificado por Marques et al. (2001), que mostraram positividade de 96,9% em pacientes confirmados. De modo que, para detecção de *Leishmania* a PCR mostra-se mais sensível do que alguns métodos convencionais parasitológicos quando isolados no diagnóstico (MARQUES et al., 2001 e 2006).

Desenvolver métodos alternativos de extração de DNA para a PCR, que possam ser rápidos, práticos, baratos, livres de contaminação e de toxicidade e eficazes no que tange à quantidade, qualidade e possibilidade de amplificação do DNA extraído, pode possibilitar

estudos em diagnósticos retrospectivos, identificação de indivíduos, estudos populacionais, envios de amostras à distância e aplicações na medicina forense (BAREA et al., 2004).

Neste estudo, vários métodos de extração de DNA foram empregados em diferentes amostras biológicas para a PCR. A partir de biópsias e de material biológico de lâminas (aposição e esfregaço) não foi possível avaliar o rendimento da extração, já que o DNA humano é extraído juntamente com o do parasita e posteriormente usado na PCR. Adicionalmente, estes DNAs apresentaram-se degradados, conforme arraste visualizado em gel de agarose. Vale destacar que são processos que necessitam basicamente de proteinase K, água ou TE, aquecimento e centrifugação para as biópsias; água ou TE, aquecimento e centrifugação para os esfregaços em lâminas; o que confere simplicidade e baixo custo no processo. Uma possível desvantagem no DNA oriundo destes materiais biológicos seria a de conter inibidores da PCR, como a hemoglobina, que possui íons  $Fe^{2+}$ , os quais são competidores dos íons  $Mg^{2+}$ , necessários à ação da *Taq* polimerase, provocando assim redução na atividade desta enzima. Tais inibidores parecem ser resistentes à fervura, não destruídos por proteinases e não solúveis em solventes orgânicos (BAREA et al., 2004). Contudo este fato não ocorreu, justamente pela amplificação de amostras, cujas extrações se deram a partir destes tipos de materiais biológicos. Adicionalmente, o rendimento do DNA extraído do parasita a partir de biópsia e de aposições/esfregaços em lâmina depende diretamente da quantidade das formas amastigotas presentes. Deste modo, a coleta destes materiais em lesões recentes e em áreas adequadas é fundamental, sendo que neste caso a quantidade de formas amastigotas é maior, o que favorece o rendimento.

Em relação à extração a partir de cultura, foi possível avaliar o rendimento frente aos métodos empregados (kit Wizard e técnica do fenol-clorofórmio). Com o kit Wizard o rendimento foi maior, ainda que pela técnica do fenol-clorofórmio a obtenção de DNA tenha sido alta. Talvez a utilização de diferentes reagentes, bem como de um menor número de etapas, diminuindo assim a possibilidade de perda de DNA, sejam fatores que determinem melhor resultado com o kit. Contudo, a extração pela técnica do fenol-clorofórmio manteve o DNA por mais tempo sem degradação. Com a obtenção de DNA de boa qualidade, foi possível ter um parâmetro positivo de comparação na reação de PCR.

A escolha de alvos moleculares adequados pode fornecer informações importantes sobre o gênero, espécie e possíveis variações moleculares do parasita *Leishmania*, quando presentes no material biológico dos pacientes, bem como auxiliar no diagnóstico da LTA. Deste modo, os minicírculos de kDNA são alvos moleculares ideais para a identificação de

*Leishmania*, devido ao alto número de cópias presentes em cada parasita e a possibilidade de usar a região conservada para amplificar seqüências específicas de DNA do gênero *Leishmania*. Neste trabalho, nas metodologias de extração onde o DNA total sofreu degradação, foi possível utilizar o kDNA; fato confirmado pela amplificação de fragmentos a partir deste tipo de amostra. Possivelmente, o menor tamanho do kDNA em relação ao DNA total, bem como seu alto número de cópias, podem ser fatores que favoreçam sua utilização nestas condições. Outros alvos moleculares como a glicose-6-fosfato desidrogenase, gp63, mini-exon e o ITS ribossomal têm sido descritos. Contudo, o uso de alvos moleculares menos abundantes, comparado aos minicírculos, pode levar a ensaios menos sensíveis (VOLPINI et al., 2004).

Com os iniciadores 150/152 os resultados confirmaram exequibilidade e sensibilidade na identificação e diagnóstico de LTA. A positividade das reações envolvendo estes iniciadores foi alta (93,7% em amostras de pacientes confirmados para LTA) o que justifica seu emprego, principalmente em amostras que requerem extração de DNA simplificada e de baixo custo, como em lâminas e biópsias. Ainda, vale destacar que a positividade é compatível com a de outros iniciadores que amplificam também a região conservada do minicírculo de kDNA, e que são utilizados em identificação e diagnóstico de LTA como 13A e 13B (RODGERS et al., 1990). Medeiros et al. (2002), usando os iniciadores 13A e 13B, obtiveram 81,5% de positividade quando comparada à presença de *Leishmania* em histopatologia, enquanto que Rodriguez et al. (1994), alcançaram 97,0%. Volpini et al. (2004) utilizando os iniciadores 150/152, demonstraram que o DNA extraído e amplificado era realmente de *Leishmania*, pela clonagem e seqüenciamento do fragmento de 120pb; através da comparação desta seqüência com outras de *Leishmania* depositadas no *Genbank*<sup>1</sup>.

A região não conservada do minicírculo de kDNA é um alvo extremamente valioso, justamente por apresentar possíveis variações na seqüência de nucleotídeos, o que pode gerar fragmentos com diferentes tamanhos. Neste sentido, o emprego dos iniciadores 13Y/13Z que amplificam esta região variável é justificado tanto na identificação de *Leishmania*, quanto no diagnóstico da LTA. Os resultados mostraram que houve amplificação de fragmentos de aproximadamente 650pb para as cepas padrão de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Contudo, Rodgers et al. (1990) utilizando estes mesmos iniciadores, observaram que, para diferentes espécies de *Leishmania*, houve polimorfismo de fragmentos. Esta situação pode ser justificada pelo fato de que em *Leishmania* ocorrem aproximadamente dez classes de

---

<sup>1</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

minicírculos, que diferem entre si na região variável, sendo que suas seqüências podem variar de 1 a 2% e ainda, o número de minicírculos em cada classe é muito variável (NOYES et al., 1998). Em nosso estudo, foi observada a presença de bandas inespecíficas, provavelmente, pelo anelamento com seqüências complementares dentro da própria região variável ou diferenças nas classes de minicírculos entre os próprios isolados.

A diferença percentual de positividade com os iniciadores 13Y/13Z em relação ao 150/152, a partir do material obtido de pacientes com lesões sugestivas, não foi significativa o que pode justificar o uso deste na detecção da região variável do minicírculo do kDNA de *Leishmania*. Todavia, quando esta comparação foi feita com pacientes confirmados para LTA, os dados mostraram diferença significativa. Em relação à sensibilidade da PCR frente à região conservada e variável, segundo Noyes et al. (1998) a amplificação da região conservada é de uma a três vezes maior, provavelmente por seu menor tamanho, o que também diminui as chances de degradação. Deste modo, esta região do minicírculo é um importante alvo para diagnóstico em áreas onde não há necessidade de identificar a espécie infectante. Vale ressaltar que foi a primeira vez que se utilizou estes iniciadores (13Y/13Z) com amostras de DNAs oriundas de aposição em lâminas de pacientes do SSMG e VRD. Isto mostra que a extração de DNA a partir deste material não levou a presença de inibidores na reação de PCR; o que também pode ser notado pela amplificação de DNA a partir de biópsias.

A RFLP pode fornecer importantes informações, tanto na identificação da espécie de *Leishmania* envolvida, quanto no tratamento a ser empregado. Berzunza-Cruz et al. (2000), estabeleceram correlação entre variabilidade no padrão de bandas pela PCR-RFLP de isolados, região geográfica e tratamento. O perfil de restrição da região conservada do minicírculo de kDNA mostrou ser útil para identificar *Leishmania*, sendo o perfil de amostras clínicas idêntico ao de cepas de referência, em contraste com o que foi observado usando a região variável ou inteira (VOLPINI et al., 2004). Neste trabalho o fragmento de 120 pb (amplificado pela maioria dos isolados, com os iniciadores 150/152) foi submetido à digestão enzimática, sendo que todos os isolados apresentaram o mesmo perfil de bandas ao da cepa de *L. (V.) braziliensis*. Isto comprova a prevalência desta espécie nas regiões estudadas, bem como a homogeneidade das manifestações clínicas dos pacientes, as quais estão relacionadas com a reposta do hospedeiro e a espécie envolvida. Outros autores como Berzunza-Cruz et al. (2000), empregaram outras enzimas de restrição para caracterização molecular; contudo, neste estudo, se utilizou apenas a enzima HaeIII, para identificação e diferenciação das cepas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Segundo Volpini et al. (2004), esta enzima

apresenta alta especificidade para *L. (V.) braziliensis*, habilidade de gerar perfis de restrição facilmente distinguíveis, baixo custo e disponibilidade. A utilização da PCR e RFLP a partir de DNAs originários de diferentes amostras (biópsias, cultura e esfregaços em lâminas), possibilitou a comparação dos resultados frente a diferentes processos, tanto de extração quanto a de origem do DNA *template*. É importante salientar que foi a primeira vez que se utilizou a PCR com os iniciadores 13Y/13Z em materiais biológicos de pacientes com LTA do SSMG e do VRD, e os iniciadores 150/152 no SSMG.

### 7.3 Tratamento

Para o tratamento dos pacientes, a principal droga empregada foi o Sb<sup>V</sup> seguido pelas de segunda escolha (anfotericina B e pentamidina) na região SSMG. Nesta, a dose empregada variou de <10 mg Sb<sup>V</sup>/Kg/dia a >20 mg Sb<sup>V</sup>/Kg/dia, durante 20 dias conforme orientação do Ministério da Saúde (2002). Em 6,8% dos pacientes a medicação utilizada foi ignorada. A falta de informação neste item deve-se provavelmente ao fato de se utilizar medicações que não estejam no campo de preenchimento do SINAN, à falta de prontuários completos sobre a medicação determinada ou ainda por erros de digitação, esquecimento e outros. Na região do VRD o Sb<sup>V</sup> foi empregado em 96,9% dos pacientes, sendo a dose <10mg Sb<sup>V</sup>/Kg/dia a mais usada (40,3%). Nesta região existe uma diferença no tratamento, sendo a medicação usada por 10 dias consecutivos, com intervalo de 10 dias, e este tratamento é mantido até a completa cicatrização da lesão. Uma evidência do sucesso neste modo de tratamento está representada pelo baixo percentual de recidiva (0,9%). Na região do SSMG após 20 dias de tratamento e 10 de descanso, o paciente só retorna às unidades de saúde depois de 3 meses, conforme recomendado pelo Ministério da Saúde (2002). Talvez a contenção de custos, falta de pessoal capacitado, sejam alguns dos possíveis motivos da interrupção do tratamento por um período tão longo (3 meses), salvo em situações em que o paciente necessite de interromper a terapia. Vale ressaltar que 16,7% dos casos na região do VRD ainda não foram concluídos, o que se deve ao longo período de tratamento dos pacientes nesta área. É importante destacar que a causa de óbitos dos pacientes com LTA registradas nas regiões SSMG e VRD no item 6.1.6, não foi especificada nas fichas de notificação, portanto não estão necessariamente relacionadas à LTA.

Ainda em relação ao VRD, 3,1% dos pacientes estão sendo tratados com a vacina Leishvacin® (Biobrás). Em pacientes com problemas cardíacos, hepáticos e renais, o emprego dos compostos antimoniais não é aconselhável e com isso são submetidos ao

tratamento com vacina. MAYRINK et al. (2006) mostraram que a associação entre compostos antimoniais e vacina (imunoterapia) alcançou o mesmo percentual de cura com tratamento padrão (100%) e foi capaz também de reduzir a concentração de sal em 17,9% e os dias de tratamento de 87 para 62, diminuindo deste modo os efeitos colaterais.

A variação na resposta clínica aos antimoniais pentavalentes tem sido um problema persistente no tratamento de leishmanioses nos últimos 50 anos. Existe uma diferença intrínseca na sensibilidade das espécies a estes antimoniais (CROFT, 2001). Considera-se a heterogeneidade da resposta ao antimônio entre diferentes espécies de *Leishmania* como propriedades inatas ou resistência adquirida e isto é devido a condições não ideais de tratamento (MOREIRA et al., 1998). A carência na resposta à quimioterapia convencional é de interesse para o estudo das causas de resistência em leishmanioses (ANACLETO et al., 2003). O mecanismo de resistência aos compostos de antimônio não está bem claro e fatores tais como mudanças na farmacocinética, pureza da droga, concentrações sub-ótimas e estado imune do hospedeiro têm sido citados como causas aparentes da resistência ou falência à resposta ao tratamento (ABDO et al., 2003). Finalmente vale ressaltar que as características do parasito e do hospedeiro podem ser responsáveis pelos aspectos clínicos da doença (CUPOLILLO et al., 2003). A diferença na sensibilidade das espécies de *Leishmania* frente ao tratamento é extremamente complexa, e envolve o polimorfismo das apresentações clínicas das espécies provenientes de diferentes áreas geográficas (BERZUNZA-CRUZ et al., 2000), levando a uma adequação do tratamento. No estudo da casuística não houve diferenças na apresentação clínica da LTA.

Os pacientes do levantamento epidemiológico reagiram bem ao tratamento, contudo alguns pacientes confirmados não responderam à medicação empregada e nestes casos de falência foi empregado o Sb<sup>V</sup> em 12,0% dos casos na região SSMG, informação não obtida no VRD. Em 52,5% dos casos de LTA da região SSMG, as fichas de notificação foram preenchidas com o item “não se aplica”. Esta parcela corresponde àqueles pacientes que mudaram, faleceram, não foram às GRS para acompanhamento ou outro fator que os impediram de fornecer dados. Todavia, por ser quase metade da população sem resposta, este dado relevante fica sem emprego em uma possível adequação de tratamento em caso de falência.

Embora haja tratamento para LTA, o empenho dos pacientes em segui-lo não é fácil principalmente pelos efeitos colaterais, o que afeta diretamente a evolução clínica da doença. Deste modo, foi observado que uma pequena parcela, mas ainda relevante, abandonou o

tratamento. Aqueles pacientes que tiveram alta por cura chegaram ao percentual de 92,0%, indicando sucesso com a medicação empregada na região SSMG. No VRD o percentual de alta por cura também foi alto, mostrando eficiência no tratamento, além de que apenas 0,7% chegaram a óbito.

O acompanhamento dos pacientes com LTA é fundamental para a conclusão dos casos. Neste sentido a PCR pós-tratamento é uma alternativa para a confirmação de cura. O resultado da PCR com os iniciadores 150/152 a partir de DNA de lâminas pós-tratamento, apresentou um baixo percentual de positividade (10,0%), sendo positiva a do VRD. A disseminação hematogênica e/ou linfática do parasito é uma explicação provável da ocorrência de manifestação mucosa ou de lesões cutâneas recorrentes. Parasitos de *Leishmania* foram isolados de drenagem de nódulos linfáticos próximos a lesões (COUTINHO et al., 2002). Uma pesquisa cuidadosa em áreas altamente endêmicas do Brasil mostrou que a linfadenopatia pode ocorrer em taxas de até 77,0%; normalmente precedendo as lesões de pele em média 2 semanas (SOUSA et al., 1995). A presença de *Leishmania* em amostras de sangue foi demonstrada em casos de leishmaniose visceral através de cultura ou PCR, e ambos os procedimentos têm sido sugeridos como métodos de diagnóstico. Em LTA, o isolamento de *Leishmania* do sangue em geral, não tem tido muito sucesso (CUBA-CUBA et al., 1986). Todavia, o emprego da PCR é justificado, principalmente por ser improvável que o DNA possa persistir no hospedeiro na ausência do parasita. De fato, foi demonstrado experimentalmente que o DNA de *Leishmania* injetado nas patas de ratos não foi detectado via PCR após 24 horas (COUTINHO et al., 2002). Coutinho et al. (2002) mostraram que a positividade da PCR foi de 25,0% a partir de esfregaço sanguíneo pós-tratamento de pacientes que tinham sido tratados e curados, mas que ainda viviam em áreas endêmicas, mesmo 10 anos após a cura.

Os pacientes da casuística acompanhados até o momento, não apresentaram problemas relacionados ao tratamento, como a falência à medicação empregada, porém outras dificuldades devem ser consideradas no diagnóstico e tratamento da LTA do SSMG como aquelas tratadas a seguir.

#### **7.4 Considerações finais**

O presente trabalho analisou os dados referentes à epidemiologia da LTA na região SSMG e do VRD por meio das informações fornecidas pelas GRS e pelo ambulatório de Leishmanioses “Dr. Paulo Araújo Magalhães” de Caratinga, além da casuística de 39

pacientes sugestivos para LTA. O perfil de transmissão também foi verificado e deve ser considerado nas medidas de controle desta doença. Os dados também mostraram valores estimuladores no que se refere ao tratamento. A falta de preenchimento de dados nas fichas do SINAN pode atrasar a elaboração de programas que visem a adequação de diagnóstico, tratamento e medidas profiláticas e de controle da doença, sendo pontos que também devem ser revistos pelos serviços de saúde pública. Além disso, centros de referência em diagnóstico e tratamento da LTA deveriam ser implantados na região do SSMG, bem como, o acompanhamento dos casos pelos órgãos responsáveis. Estudos epidemiológicos envolvendo vetores e reservatórios devem ser considerados para aumentar a eficiência nos serviços de saúde relacionados às doenças de notificação de agravos como a LTA. Junta-se a isso a necessidade de se utilizar testes que facilitem e aumentem a exatidão no diagnóstico da LTA, além de empregar técnicas de biologia molecular que ampliem as chances de se detectar o parasita quando os demais testes não forem conclusivos. Técnicas moleculares como hibridação, seqüenciamento e outras são necessárias à caracterização molecular, bem como para estudar os mecanismos de resistência aos antimoniais, pela pesquisa de genes relacionados às vias metabólicas dos fármacos e pelo estudo da expressão desses genes. Este trabalho fornece valiosas informações para o desenvolvimento de planos de controle, diagnóstico e tratamento da LTA.

## 8 CONCLUSÃO

- O número de casos de LTA tem diminuído nas regiões analisadas;
- Há falhas para se chegar ao diagnóstico conclusivo da LTA;
- Um alto percentual de pacientes tem respondido bem ao tratamento com Sb<sup>V</sup> em ambas as regiões estudadas;
- Há falta de centros de referência em leishmaniose na região SSMG;
- A extração de DNA foi executada com sucesso e com menor custo;
- Foi possível a amplificação de seqüências específicas de DNA, tanto da região conservada quanto da variável dos minicírculos do kDNA com diferentes iniciadores, o que pode auxiliar na detecção e diagnóstico da LTA;
- Através da PCR e PCR-RFLP foi possível identificar as amostras como de *L.(V.) braziliensis*, bem como identificar e diferenciar cepas de *L.(L.) amazonensis* de *L.(V.) braziliensis* no VRD e no SSMG.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDO, M., G.; ELAMIN, W., M.; KHALIL, E., A., G.; MUKHTAR, M., M. Antimony resistant *Leishmania donovani* in eastern Sudan: incidence and in vitro correlation. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 9, n. 4, p. 837-843, 2003.
- ANACLETO, C.; ABDO, M., C., B.; FERREIRA, A., V., B.; MURTA, S., M., F.; ROMANHA, A., J.; FERNANDES, A., P.; MOREIRA, E., S., A. Structural and functional analysis of an amplification containing a *PGPA* gene in a glucantime-resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis* cell line. **Parasitology Research**, v. 90, p. 110-118, 2003.
- ANDRADE, M., S.; BRITO, M., E., F.; DA SILVA, T.; LIMA, B., S.; ALMEIDA, E., L.; ALBUQUERQUE, E., L.; JÚNIOR, J., F., M.; ISHIKAWA, E.; CUPOLILLO, E.; BRANDÃO-FILHO, S., P. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38 n. 3, p. 229-233, 2005.
- ANDRADE, H., M.; REIS, A., B.; DOS SANTOS, S., L.; VOLPINI, A., C.; MARQUES, M., J.; ROMANHA, A., J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 10, n. 3-4, p. 231-238, 2006.
- AVILES, H.; BELLI, A.; ARMIJOS, R.; MONROY, F., P.; HARRIS, E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. **Journal Parasitology**, v. 85, p. 181-187, 1999.
- BAREA, J., A.; PARDINI, M., I., M., C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 274-281, 2004.
- BARKER, D., C.; GIBSON, L., J.; KENNEDY, W., P., K.; NASSER, A., A., A.; WILLIAMS, R., H. The potential of using recombinant DNA species-specific probes for the identification of tropical *Leishmania*. **Parasitology**, v. 91, p. 139-174, 1986.
- BARKER, D., C. Molecular approaches to DNA diagnosis. **Parasitology**, v. 99, p. 125-146, 1989.
- BASTRENTA, B.; MITA, N.; BUITRAGO, R.; VARGAS, F.; FLORES, M.; MACHANE, M.; YACSIK, N.; TORREZ, M.; LE PONT, F.; BRENIÈRE, F. Human mixed infections of *Leishmania* spp. and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a sub Andean Bolivia area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 2, p. 255-264, 2003.

BELLI, A.; RODRIGUES, B.; AVILES, H.; HARRIS, E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 1, p. 102-109, 1998.

BERZUNZA-CRUZ, M., B.; BRICAIRE, G.; ROMERO, Z.; BECKER, R., P.; LIRA, E., S.; MONTFORT, R., P.; ROSSI, M., C.; CASTREJON, O., V.; BECKER, I. *Leishmania mexicana mexicana*: genetic heterogeneity of mexican isolates revealed by restriction length polymorphism analysis of kinetoplast DNA. **Experimental Parasitology**, v. 95, p. 277-284, 2000.

BOECKEN, G., H. **New World tegumental leishmaniasis in Brazil: with special reference to the situation of the disease in Manaus Central Amazon basin** London. 1996 (Dissertação de Mestrado University of London).

BRANDÃO, F., S.; CAMPBELL, L., D.; BRITO, M., E., F.; SHAW, J., J.; DAVIES, C., R. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 488-494, 1999.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico/ Fundação nacional de Saúde/FUNASA**. Brasília, DF, edição especial, 1999, p. 15-16.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Fundação Nacional de Saúde/FUNASA. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 5. ed. Brasília, DF, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico de Leishmaniose / Centro Nacional de Epidemiologia / FUNASA**. Brasília, DF, v. 2, n. 6, 2002, p. 7-8.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Rede interagencial de informações para a saúde (RIPSA)**, Brasília, DF, 2004, 2p.

BRASIL. MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Indicadores Sociais Municipais**. Brasília, DF, 2005. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/população/censo2000>. Acesso em 07 maio 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sistema de Vigilância em Saúde (SVS), Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN)**. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br>. Acesso em 29 abr. 2007.

CAMPBELL, L., D.; DUJARDIN, J., P.; MARTINEZ, E.; FELICIANGELI, D.; PEREZ, J., E.; SILANS, L. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities.

**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 159-162, 2001.

CASTILHO, T., M.; SHAW, J., J.; WINTER, L., M., F. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 540-546, 2003.

COSTA, J., M., L.; BALBY, I., T., A.; ROCHA, B., J., S., R.; SILVA, A., R.; REBELO, J., M., M.; FERREIRA, L., A. - Estudo comparativo da leishmaniose tegumentar americana em crianças e adolescentes procedentes das áreas endêmicas de Buriticupu (Maranhão) e Corte de Pedra (Bahia), Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 279-288, 1998.

COUTINHO, S., G.; PIRMEZ, C.; DA-CRUZ, A., M. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 173-178, 2002.

CROFT, S., L. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 2, p. 899-905, 2001.

CUBA-CUBA, C., A.; LLANOS-CUENTAS, E., A.; BARRETO, A., C.; MAGALHÃES, A., V.; LAGO, E., L.; REED, S., G.; MARSDEN, P., D. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia - Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. I. Laboratory diagnosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 17, p. 161-167, 1984.

CUBA-CUBA, C., A.; LLANOS-CUENTAS, E., A.; MARSDEN, P., D. Failure to detect circulating *Leishmania* in mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 2, p. 346, 1986.

CUPOLILLO, E.; MEDINA, A.; COSTA, E.; NOYES, H.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 4, p. 142-144, 2000.

CUPOLILLO, E.; BRAHIM, L., R.; TOALDO, C., B.; OLIVEIRA, M., P.; BRITO, M., E., F.; FALQUETO, A.; NAIFF, M., F.; GRIMALDI, G. Genetic Polymorphism and Molecular

Epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3126-3132, 2003.

DE-BRUJIN, M., H., L.; BARKER, D., C. Diagnosis of new world leishmaniasis: specific detection of species of the *L. braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, v. 52, p. 45-58, 1992.

DE-BRUJIN, M., H., L.; LABRADA, L., A.; SMYTH, A., J.; SANTRICH, C.; BARKER, D., C. A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. **Tropical Medicine and Parasitology**, v. 44, p. 201-207, 1993.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* a mini- review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 463-469, 1994.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 239-243, 2001.

FADILI, K., E.; MESSIER, N.; LEPROHON, P.; ROY, G.; GUIMOND, C.; TRUDEL, N.; SARAVIA, N., G.; PAPADOPOULOU, B.; LÉGARE, D.; OUELLETTE, M. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1988-1993, 2005.

FERNANDES, N., C.; MORGAN, I.; MACEIRA, J., P.; CUZZI, T.; NOE, R., A., M. Leishmaniose tegumentar americana: casuística hospitalar no Rio de Janeiro. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 74, p. 431-439, 2004.

FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar americana. In: Machado – Pinto, J. **Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1994. p. 319-328.

GENARO, O.; TOLEDO, V., P., C., P.; DA COSTA, C., A.; HERMETO, M., V.; AFONSO, L., C., C.; MAYRINK, W. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p. 503-512, 1996.

GONTIJO, B. **A PCR no diagnóstico da LTA**. 1997. 92f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.

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

GONTIJO, B.; CARVALHO, M., L., R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GUERRA, J., A., O.; RIBEIRO, J., A., S.; COELHO, L., I., A., R.; BARBOSA, M., G., V.; PAES, M., G. Epidemiology of tegumentary leishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil. **Caderno de saúde Pública**, v. 22, p. 2319-2327, 2006.

HENIC, D., F., H.; OSKAM, S.; OSKAM, L. Review: molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, n. 8, p. 641-651, 2001.

KAPOOR, G., S.; ARORA, S., K.; SCHGAL, S. Genetic polymorphism of *Leishmania* species using kinetoplast DNA restriction fragment length polymorphism and cDNA probe of *Leishmania donovani*. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 186, p. 209-214, 1998.

LACERDA, M., M. The Brazilian leishmaniasis control program. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 489-495, 1994.

LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 321, p. 389-404, 1988.

LAINSON, R.; SHAW, J., J. The subgenus *Leishmania* (*Leishmania*): a citation correction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 2, p. 228, 2000.

LEE, S., Y.; LEE, S., T.; CHANG, K., P. Transkinetoplastidy - A novel phenomenon involving bulk alterations of mitochondrion – kinetoplast DNA of a Trypanosomatid protozoan. **Journal Protozoology**, v. 39, n. 1, p. 190-196, 1992.

LEE, S., T.; TARN, C.; CHANG, K., P. Characterization of the switch of kinetoplast DNA minicircle dominance during development and reversion of drug resistance in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 58, p. 187-204, 1993.

LIMA, E., B.; PORTO, C.; DA MOTTA, J., O., C.; SAMPAIO, R., N., R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.

LOIOLA, C., F. **Epidemiologia das Leishmanioses no sul do Estado de Minas Gerais, Brasil: aspectos referentes à transmissão vetorial (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae)**. 2003. 118f. Tese (Doutorado em Saúde Pública). São Paulo: Universidade de São Paulo, 2003.

LOPEZ, M.; INGA, R.; CANGALAYA, M.; ECHEVARRIA, J.; LLANOS-CUENTAS, A.; ORREGO, C.; AREVALO, J. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 3, p. 348-356, 1993.

MAGALHÃES, A., V.; MORAIS, M., A., P.; RAICK, N., A. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*: padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 253-262, 1986.

MARQUES, M., J.; VOLPINI, A., C.; GENARO, O.; MAYRINK, W.; ROMANHA, A., J. Simple form of clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 902-906, 2001.

MARQUES, M., J.; VOLPINI, A., C.; MACHADO-COELHO, G., L., L.; MACHADO-PINTO, J.; DA COSTA, C., A.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; ROMANHA, A., J. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 54, p. 37-43, 2006.

MARQUIA, N.; GOURBAL, B.; ROSEN, B., P.; MUKHOPADHYEY, R.; OUELLETTE, M. Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistance *Leishmania*. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1690-1699, 2005.

MARZOCHI, M., C., A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 63, n. 5-6, p. 82-104, 1992.

MARZOCHI, M., C.; MARZOCHI, K., B., F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, p. 359-375, 1994. Supplement. 2.

MAYRINK, W.; MELO, M., N.; DA COSTA, C., A.; MAGALHÃES, P., A.; DIAS, M.; COELHO, M., V.; ARAÚJO, F., G.; WILLIAMS, P.; FIGUEIREDO, Y., P.; BATISTA, S., M. Intradermorreação de Montenegro na leishmaniose tegumentar americana após terapêutica antimonial. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 18, n. 3, p. 182-185, 1976.

MAYRINK, W.; MAGALHÃES, P., A.; MICHALICK, M., S., M.; DA COSTA, C., A.; LIMA, A., O.; MELO, M., N.; TOLEDO, V., P., C., P.; NASCIMENTO, E.; DIAS, M.; GENARO, O.; HERMETO, M., V.; WILLIAMS, P. Immunotherapy as a treatment of american cutaneous leishmaniasis: preliminary studies in Brazil. **Parasitologia**, v. 34, p. 159-165, 1992.

MAYRINK, W.; BOTELHO, A., C., C.; MAGALHÃES, P., A.; BATISTA, S., M.; LIMA, A., O.; GENARO, O.; DA COSTA, C., A.; MELO, M., N.; MICHALICK, M., S., M.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; CAIAFFA, W., T.; NASCIMENTO, E.; MACHADO-COELHO, G., L., L. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.1, p.14-21, 2006.

MEDEIROS, A., C., R.; RODRIGUES, S., S.; ROSELINO, A., M., F. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Brasilian Journal of Medical Biological Research**, v. 35, p.421-424, 2002.

MELO, M., N.; MAYRINK, W.; DA COSTA, C., A.; MAGALHÃES, P., A.; DIAS, M.; WILLIAMS, P.; ARAUJO, F., G.; COELHO, M., V.; BATISTA, S., M. Padronização do antígeno de Montenegro. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 19, n. 3, p. 161-164, 1977.

MOREIRA, E., S., A.; ANACLETO, C.; PEIXOTO, M., L., P. Effect of glucantime on field and patient isolates of New World *Leishmania*: use of growth parameters of promastigotes to assess antimony susceptibility. **Parasitology Research**, v. 84, p. 720-726, 1998.

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

NOYES, H., A.; REYBURN, H.; BAILEY, J., W.; SMITH, D. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from

clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2877-2884, 1998.

OLIVEIRA NETO, M., P.; MATTOS, M., S. Successful therapeutic response of resistant cases of mucocutaneous leishmaniasis to a very low dose of antimony. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 3, p. 376-378, 2006.

PASSOS, V., M., A.; LASMAR, E., B.; GONTIJO, C., M., F.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 19-20, 1996.

PASSOS, V., M., A.; FERNANDES, O.; LACERDA, P., A., F.; VOLPINI, A., C.; GONTIJO, C., M., F.; DEGRAVE, W.; ROMANHA, A., J. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the predominant species infecting patients with american cutaneous leishmaniasis in the state of Minas Gerais, southeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 72, p. 251-258, 1999.

PASSOS, V., M.; BARRETO, S., M.; ROMANHA, A., J.; KRETTLI, A., U.; VOLPINI, A. C.; GONTIJO, C., M.; FALCÃO, A., L.; LIMA-COSTA, M., F. Cutaneous leishmaniasis in the Metropolitan region of Belo Horizonte: clinical, laboratorial, therapeutic and prognosis features (1989-1995). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 5-12, 2001.

PENNA, S., D., J. Razões para banir o conceito de raça da Medicina Brasileira. **História, Ciências, Saúde**, v. 12, n. 2, p. 321-346, 2005.

PIRMEZ, C.; TRAJANO, V., S.; NETO, M., P.; DA-CRUZ, A., M.; GONCALVES DA COSTA, S., C.; CATANHO, M.; DEGRAVE, W.; FERNANDES, O. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1819-1823, 1999.

RODGERS, M., R.; POPPER, S., J.; WIRTH, D., F. Amplification of Kinetoplast DNA as a Tool in the Detection and Diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, p. 267-275, 1990.

RODRIGUEZ, N.; GUZMAN, B.; RODAS, A.; TAKIFF, H.; BLOOM, B., R.; CONVIT, J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2246-2252, 1994.

ROMERO, G., A.; GUERRA, M., V.; PAES, M., G.; CUPOLILLO, E.; BENTIN TOALDO, C.; MACEDO, V., O.; FERNANDES, O. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the

diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. **Acta Tropica**, v. 79, p. 225-229, 2001.

SAFAEI, A.; MOTAZEDIAN, M., H.; VASEI, M. Polymerase chain reaction for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in histologically positive, suspicious and negative skin biopsies. **Dermatology**, v. 205, p. 18-24, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E., F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**. A laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SARAVIA, N., G.; WEIGLE, K.; SEGURA, I.; GIANNINI, S., H.; PACHECO, R.; LABRADA, L., A.; GONÇALVES, A. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection – reactivation or reinfection? **The Lancet**, v. 336, p. 398-402, 1990.

SCHUBACH, A.; MARZOCHI, M.; ARAÚJO, M., L.; CONCEIÇÃO, N., F. Healed lesion of cutaneous leishmaniasis - a positive culture for *Leishmania* sp. in the scar tissue years after cure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 64, 1987.

SCHUBACH, A.; HADDAD, F.; NETO, M., P.; DEGRAVE, W.; PIRMEZ, C.; GRIMALDI, J.; FERNANDES, O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **Journal Infectious Diseases**, v. 178, p. 911-914, 1998.

SINGH, N.; SINGH, R., T.; SHYAM, S. Novel mechanism of drug resistance in Kala Azar field isolates. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, p. 650-607, 2003.

SOUSA, A., Q.; PARISE, M., E.; POMPEU, M., M.; COELHO FILHO, J., M.; VASCONCELOS, I., A.; LIMA, J., W.; OLIVEIRA, E., G.; VASCONCELOS, A., W.; DAVID, J., R.; MAGUIRE, J., H. Bubonic leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceara, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 380-385 1995.

VOLPINI, A., C.; PASSOS, V., M., A.; OLIVEIRA, G., C.; ROMANHA, A., J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90, p. 31-37, 2004.

WEIGLE, K., A.; SANTRICH, C.; MARTINEZ, F.; VALDERRAMA, L.; SARAVIA, N., G. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: a longitudinal study of the natural

history, prevalence, and incidence of infection and clinical manifestations. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 168, p. 699-708, 1993.

WEIGLE, K.; SARAVIA, N., G. Natural history, clinical evolution and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p. 433-450, 1996.

WIRTH, D., F.; MCMAHON-PRATT, D. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 77, p. 6810-6814, 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of leishmaniasis. Report of a WHO Expert committee**. Geneva: World Health Organization, 1990. WHO Technical Report Series, n. 793.

**ANEXOS****Anexo A:**

Seqüência dos iniciadores:

---

Iniciador	Seqüência de nucleotídeos
150	5'GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA 3'
152	5'(C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC3'
13Y	5'CGCCCCTCCCCCACGGGG3'
13Z	5'ACTGGGGGTTGGTGTAATAATAG3'

---

Fonte: 150/152 (DEGRAVE et al., 1994, PASSOS et al., 1996) e 13Y/13Z (RODGERS et al., 1990).