LUCIANA NEVES PASSOS

Avaliação da reação em cadeia de polimerase (PCR) no diagnóstico da leishmaniose cutânea no Estado do Espírito Santo, Brasil.

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

SÃO PAULO

2003

LUCIANA NEVES PASSOS

Avaliação da reação em cadeia de polimerase (PCR) no diagnóstico da leishmaniose cutânea no Estado do Espírito Santo, Brasil.

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Aloísio Falqueto

SÃO PAULO

2003

“Nunca se alegue, para excluir a pesquisa do ensino médico, que não raro o pesquisador se desvia para os domínios da ciência pura, e pouco aproveitará, daí por diante, a evolução da medicina. Eu sei, em verdade, onde o limite entre as ciências puras e as de aplicação. A ciência é única, e o que hoje representa uma conquista científica abstrata, sem qualquer fundo utilitário, será amanhã uma noção aplicada, e às vezes, do mais alto alcance prático.”

(Carlos Chagas, 1928)

À minha família, em especial aos meus pais, Maria Lúcia e Elson, e meus irmãos, Carlos Henrique e Rogério, que mantêm um investimento pessoal em todos os meus projetos ao longo destes anos.

Ao meu orientador e amigo, Heitor, sábio, especialista na arte de ensinar, que mais de uma vez depositou créditos no desempenho do meu trabalho.

Ao “meu Edú”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sem o qual nada seria de fato.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior e a Byanca Paiva, do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo (FMUSP), pelos grandes momentos de discussão, pela obstinação e perseverança, e pelo auxílio no desenvolvimento de todo projeto experimental e teórico. Agradeço também a todos integrantes deste Laboratório, pela recepção e pela ajuda em todas as questões que se sucederam durante o planejamento e processo de realização da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Aloísio Falqueto do ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM), e ao Prof. Dr. Elton Lucas do setor de Patologia do HUCAM, pelas amostras utilizadas neste estudo e críticas pertinentes.

Às Profas. Dras. Carla Pagliari e Maria Irma Seixas Duarte do Laboratório da disciplina de Patologia de Moléstias Infecciosas e Parasitárias e Laboratório de Imunopatologia de Esquistossomose da FMUSP e todo pessoal deste laboratório, pela colaboração na realização da imunohistoquímica.

A Ângela Volpini, Dr. Álvaro Romanha, e Sara Lopes dos Santos, do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou- FIOCRUZ, Belo Horizonte, pela colaboração na realização da PCR-RFLP. Agradeço ainda a Ângela pela troca de informações e discussões sobre o texto.

A Lis Vilela de Almeida, setor de Patologia do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, pela confecção de lâminas silanizadas.

A Eduardo Oliveira Campos, pela compreensão e por toda revisão gráfica.

A Carlos Henrique Neves Passos, pela impressão deste trabalho.

A Carlos Frederico Lúcio e Tâmara Newman, por me hospedarem infinitas vezes durante estes três anos, sempre disponíveis e solícitos.

A toda equipe da Comissão de Pós-Graduação "stricto-sensu" da Área de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial a Rosemeire Aparecida Moraes Ribeiro, pelo carinho e esclarecimentos na resolução de todas as questões ligadas a esta Tese, do cumprimento de créditos ao relatório final.

Agradeço à Banca de Qualificação, Dr. Antônio Carlos Nicodemo, Dr. Valdir Sabbaga Amato, e Dra Walquíria Pereira Pinto, pela discussão e sugestões que tanto me ajudaram a concluir este trabalho.

A todos os colegas do ambulatório de DIP do HUCAM, e aos colegas plantonistas da Unidade de Terapia Intensiva do Hospital da Unimed, pela grande força e ajuda durante os períodos nos quais necessitei me ausentar.

A toda minha família e amigos pelo apoio e compreensão nos momentos em que me encontrava no limite da intolerância.

Agradeço à Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES), à Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) e ao LIMHCFMUSP 49 - Protozoologia.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	III
AGRADECIMENTOS	V
SUMÁRIO	VI
LISTA DE SIGLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE QUADROS	X
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XII
SUMMARY	XIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 SITUAÇÃO E JUSTIFICATIVAS	5
1.2 OBJETIVOS	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 O AGENTE ETIOLÓGICO	11
2.2 CICLO BIOLÓGICO E PATOGENIA	16
2.3 IMUNOLOGIA	18
2.4 EPIDEMIOLOGIA	23
2.5 DIAGNÓSTICO	30
2.5.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO	31
2.5.1.1 Leishmaniose Cutânea	32
2.5.1.2 Leishmaniose Mucosa	34
2.5.1.3 Leishmaniose Ganglionar	35
2.5.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	35
2.5.2.1 Métodos Parasitológicos	36
2.5.2.1.1 Técnica para Coleta de Material	36
2.5.2.1.2 Pesquisa Direta	37
2.5.2.1.3 Cultivo “in vitro”	39
2.5.2.1.4 Inoculação em Animais	40
2.5.2.2 Histopatologia	41
2.5.2.3 Métodos Imunológicos	44
2.5.2.3.1 Intradermorreação de Montenegro	44
2.5.2.3.2 Reações Sorológicas	47
2.5.2.4 Identificação de Espécies	50
2.5.2.4.1 Análise de Zimodemas	51
2.5.2.4.2 Anticorpos Monoclonais	52
2.5.2.4.3 Diagnóstico Molecular	53
2.6 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA	54
2.6.1 ANTIMONIAIS PENTAVALENTES	56
2.6.2 ANFOTERICINA B	58
2.6.3 PENTAMIDINA	59
2.6.4 OUTRAS DROGAS	59
2.6.5 OUTRAS MODALIDADES DE TRATAMENTO	60
2.7 PROFILAXIA	61
2.8 PCR	64
2.8.1 PCR GENERALIDADES	64
2.8.2 PCR NO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA	67
3 MATERIAIS E MÉTODOS	80

3.1	DESENHO DO ESTUDO	80
3.2	POPULAÇÃO DO ESTUDO	80
3.3	AS AMOSTRAS	80
3.4	CRITÉRIOS DIAGNÓSTICO DE LC PARA INCLUSÃO DE AMOSTRAS NO ESTUDO	81
3.5	CONTROLE NEGATIVO	82
3.6	OBTENÇÃO DE DADOS DEMOGRÁFICOS E RESULTADOS DE EXAMES DIAGNÓSTICOS	82
3.7	IMUNOHISTOQUÍMICA E SEMIQUANTIFICAÇÃO DO PARASITISMO	82
3.8	EXTRAÇÃO DE MATERIAL ESTOCADO EM PARAFINA E FORMOL	83
3.9	EXTRAÇÃO DE DNA	84
3.10	PCR DE GÊNERO E SUBGÊNERO	84
3.11	PCR RFLP NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES	86
3.12	CONTROLE DAS CONDIÇÕES DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO EXPERIMENTAL	88
3.13	LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO EXPERIMENTAL	88
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	89
4	RESULTADOS	90
4.1	PCR COM “PRIMER” DE MINI-EXON	91
4.2	AMOSTRAS ESTOCADAS EM FORMOL	91
4.3	AMOSTRAS ESTOCADAS EM PARAFINA	93
4.4	COMPARAÇÃO DO RENDIMENTO DA PCR AMPLIFICANDO MINI-EXON GÊNERO ESPECÍFICO ENTRE AS AMOSTRAS ESTOCADAS EM FORMOL E PARAFINA	94
4.5	AValiação DOS MÉTODOS UTILIZADOS PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA	95
5	DISCUSSÃO	98
6	CONCLUSÕES	110
7	ANEXOS	112
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122

LISTA DE SIGLAS

GC	GUANINA-CITOSINA
DAT	TESTE DE AGLUTINAÇÃO DIRETA
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO
ELISA	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO
FIOCRUZ	FUNDAÇÃO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
FMUSP	FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE SÃO PAULO
FC	FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO
FUNASA	FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE
GM-CSF	FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS E MACRÓFAGOS
GP63	GLICOPROTEÍNA 63
H&E	HEMATOXILINA & EOSINA
HUCAM	HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CASSIANO ANTÔNIO DE MORAES
IBGE	INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E PESQUISA
ICB	INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IDRM	INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO
IFA	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA
IL	INTERLEUCINA
IMT	INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
INF	INTERFERON
IPES	INSTITUTO DE APOIO À PESQUISA E DESENVOLVIMENTO JONES DOS SANTOS NEVES
kDNA	DNA DO CINETOPLASTO
LCD	LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA
LCL	LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA
LCM	LEISHMANIOSE CUTÂNEO-MUCOSA
LNP	AMOSTRA EM FORMOL
LP	AMOSTRA EM PARAFINA
LPG	LIPOFOSFOGLICANO
LT	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
LTA	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
LV	LEISHMANIOSE VISCERAL
NNN	MEIO DE NOVY - MCNEAL – NICOLLE
OMS	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (WHO)
PAE	PEROXIDASE ANTIPEROXIDASE
PBS	SALINA TAMPONADA COM FOSFATOS
PM	PESO MOLECULAR
RAPD	ANÁLISE DE DNA POLIMÓRFICO AMPLIFICADO ALEATORIAMENTE
RFLP	ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS POLIMÓRFICAS DE DNA
RNA	ÁCIDO RIBONUCLEÍCO
RNAg	RNA GUIA
RNAr	RNA RIBOSSOMAL
SDS	SÓDIO DUODECIL SULFATO
SEPLAN	SECRETARIA DO PLANEJAMENTO
SSR-PCR	PCR DE SEQUÊNCIAS SIMPLES REPETIDAS
SSUrRNA	OLIGONUCLEOTÍDEOS COMPLEMENTARES A SEQUÊNCIAS CONSERVADAS DE PEQUENAS SUBUNIDADES DE RNA RIBOSSOMAL
TBE	TRIS/BORATO/EDTA
TE	TRIS/EDTA-ÁCIDO ETHYLENEDIAMINO TETRA-ACÉTICO
TGF	FATOR TRANSFORMADOR DE CRESCIMENTO CELULAR
TH	T HELPER
TNF	FATOR DE NECROSE TUMORAL
USP	UNIVERSIDADE SÃO PAULO
UV	ULTRAVIOLETA

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Mapa do Estado do Espírito Santo com identificação de suas divisas e regiões administrativas	6
FIGURA 2	Mapa da Região Metropolitana da Grande Vitória, Espírito Santo	7
FIGURA 3	Macrófago infectado com duas formas amastigotas de <i>Leishmania</i> coradas em H&E	12
FIGURA 4	Forma promastigota de <i>Leishmania</i> corada com Giemsa	12
FIGURA 5	Ciclo biológico da leishmaniose tegumentar americana	17
FIGURA 6	Mapa do mundo ressaltando os países com maior incidência de leishmaniose cutânea	24
FIGURA 7	Número de casos confirmados de leishmaniose tegumentar americana no Brasil de 1980 a 2001	25
FIGURA 8	Seleção das amostras segundo critérios de inclusão e exclusão	112
FIGURA 9	Seqüências completas utilizadas na construção dos “primers” de mini-exon, específico para gênero <i>Leishmania</i> (a) e subgênero <i>Viannia</i> (b)	114
FIGURA 10	Análise do amplificado da PCR com “primer” de mini-exon específico para gênero <i>Leishmania</i> , em gel de poliacrilamida 6%, realizado durante fase de teste e padronização	115
FIGURA 11	Análise dos amplificados da PCR de mini-exon específico para subgênero <i>Viannia</i> , em gel de poliacrilamida 6%, realizado durante teste e padronização	116
FIGURA 12	Análise dos amplificados da PCR de mini-exon específico para gênero <i>Leishmania</i> , de amostras fixadas em formol, em gel de poliacrilamida 6%	117
FIGURA 13	Lâminas de imunohistoquímica positivas de amostras de biópsias incluídas em parafina de pacientes com leishmaniose cutânea, Espírito Santo, Brasil	118
FIGURA 14	Análise dos amplificados da PCR de mini-exon específico para gênero <i>Leishmania</i> , de amostras incluídas em parafina, em gel de poliacrilamida 6%	119
FIGURA 15	Análise dos amplificados da PCR com “primer” de kDNA específico para gênero <i>Leishmania</i> , de amostras incluídas em parafina, em gel de poliacrilamida 6%	120
FIGURA 16	Análise dos produtos da PCR-RFLP com a enzima Hae III, específica para espécie <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> , de amostras incluídas em parafina, em gel de poliacrilamida 10%	121

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Distribuição de espécies de <i>Leishmania</i> que causam doenças nas Américas	14
Quadro 2	Leishmaniose tegumentar na América: Classificação Clínica e espécies de <i>Leishmania</i>	31
Quadro 3	Diagnóstico diferencial de leishmaniose cutânea (LC)	32
Quadro 4	Características do “primer” de mini-exon para gênero <i>Leishmania</i>	85
Quadro 5	Características do “primer” de mini-exon para subgênero <i>Viannia</i>	85
Quadro 6	“Características do “primer” de kDNA utilizado na PCR-RFLP	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	DISTRIBUIÇÃO QUANTO AO MUNICÍPIO DE ORIGEM, SEXO, E IDADE MÉDIA, DOS PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA, FONTES DAS AMOSTRAS ESTUDADAS, ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL – 1997 E 1998	92
TABELA 2	DISTRIBUIÇÃO QUANTO AO LOCAL DA LESÃO, SEXO, E IDADE MÉDIA, DOS PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA, FONTES DAS AMOSTRAS ESTUDADAS, ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL – 1997 E 1998	92
TABELA 3	COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DA PCR AMPLIFICANDO MINI-EXON GÊNERO ESPECÍFICO COM O PARASITISMO À IMUNOHISTOQUÍMICA DAS BIÓPSIA INCLUÍDAS EM PARAFINA, DE PACIENTES DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL – 1997 E 1998	94
TABELA 4	DISTRIBUIÇÃO COMPARATIVA DOS RESULTADOS DE PCR AMPLIFICANDO MINI-EXON GÊNERO ESPECÍFICO ENTRE AMOSTRAS ESTOCADAS EM FORMOL E PARAFINA DE BIÓPSIAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA, NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL – 1997 E 1998	95
TABELA 5	RESULTADOS DOS DIFERENTES MÉTODOS DIAGNÓSTICOS REALIZADOS COM AMOSTRAS DE BIÓPSIA INCLUÍDA EM PARAFINA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA, NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL – 1997 E 1998	96
TABELA 6	RESULTADOS DOS DIFERENTES MÉTODOS DIAGNÓSTICOS REALIZADOS COM AMOSTRAS DE BIÓPSIAS FIXADAS EM FORMOL, DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL – 1997 E 1998	97

RESUMO

PASSOS, L. N. **Avaliação da reação em cadeia de polimerase (PCR) no diagnóstico de leishmaniose cutânea no Estado do Espírito Santo, Brasil.**

São Paulo, 2003. 144p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina,

Universidade São Paulo.

A confirmação diagnóstica e a identificação de espécies de *Leishmania* é crucial na condução clínica da leishmaniose cutânea, com implicações terapêuticas e prognósticas, especialmente em áreas onde convivem várias espécies destes protozoários. Com o objetivo de avaliar a eficiência da reação em cadeia de polimerase (PCR) em diagnosticar e determinar a espécie envolvida na leishmaniose cutânea no Estado do Espírito Santo, Brasil, nós empregamos duas técnicas: a PCR com “primer” de mini-exon e a PCR com “primer” de kDNA, seguida pela digestão do produto amplificado por uma endonuclease - análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de DNA (PCR-RFLP). Foram testadas 71 amostras de biópsias estocadas em parafina e formol. Usando seqüências de mini-exon do gênero *Leishmania*, 62,1% (36/58) das amostras em parafina e 46,1% (6/13) das amostras em formol foram positivas. Empregando PCR-RFLP, 100% (58/58) das amostras em parafina testadas resultaram positivas e *Leishmania (V.) braziliensis* foi identificada em todas elas. Estes testes não se correlacionaram com a intensidade do parasitismo na biópsia, determinado por imunohistoquímica. A PCR representa ferramenta de grande importância no diagnóstico e determinação da espécie de *Leishmania* responsável pelos casos de leishmaniose cutânea em regiões endêmicas, podendo ser utilizada em material estocado em parafina.

SUMMARY

PASSOS, L.N. – **Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the Espírito Santo State, Brazil.** São Paulo, 2003. 144p. Thesis (Doctorate) - Medicine Faculty., São Paulo University.

The adequate management of patients with cutaneous leishmaniasis depends on confirmed diagnosis and identification of the species of the infecting agent, with therapeutic and prognostic implications, especially on endemic areas when coexist several species of this protozoan. Looking for the efficiency of a polymerase chain reaction in the diagnosis and species identification in patients with cutaneous leishmaniasis from the State of Espírito Santo, Brazil, we used this reaction with two sets of primers, one designed to detect the mini-exons genes, and another, devoted to detection of kDNA sequences, with subsequent restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP), in DNA from 71 stored samples of skin biopsies of parasitologically confirmed patients. Using the *Leishmania* genus specific mini-exon PCR, 62,1% (36/58) from paraffin stored samples and 46,1% (6/13) from formol-stored samples were positive. Using PCR-RFLP, 100% (58/58) of the paraffin stored samples were positive and showed uniformly infection with *Leishmania (V.) braziliensis*. Those tests do not correlate with immunohistochemistry quantification of tissue parasitism in the same biopsies. PCR represents important and powerful tool in the diagnosis and species identification in cutaneous leishmaniasis in endemic regions, and could be also used in paraffin stored material.

1 INTRODUÇÃO

Leishmaniose tegumentar americana (LTA) e seu envolvimento mucoso representa um problema de saúde pública em países da América do Sul e Central. Frequentemente ocasiona uma desfiguração facial extensa, provocando problemas de ordem social de grande complexidade, debilitando e incapacitando pacientes com conseqüente redução da força de trabalho em determinadas regiões, podendo, assim, criar um ciclo vicioso de pobreza e constituir barreira ao progresso (DESJEUX, 1996). Quando acomete mucosas pode evoluir progressivamente comprometendo as regiões de orofaringe e nasofaringe, tendo como desfecho até mesmo a morte (SAMPAIO et al., 1985). É causada por parasitas do gênero *Leishmania* agrupadas nos subgêneros *Leishmania* (*Viannia*) e *Leishmania* (*Leishmania*) (LAINSON & SHAW, 1987). O primeiro geralmente causa leishmaniose cutânea localizada (LCL) ou leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), enquanto o segundo geralmente não acomete mucosas ocasionando lesões cutâneas autolimitadas e de cura espontânea. A maioria dos casos de LCM nas Américas é causada por *L. (V.) braziliensis*, existindo relatos ocasionais de doença mucosa por *L. (V.) panamensis* e *L. (L.) amazonensis*. Por sua vez, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis* são responsáveis por casos de leishmaniose cutânea difusa (LCD) (BITTENCOURT et al., 1992).

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária cujo espectro clínico depende fundamentalmente da espécie de *Leishmania* envolvida e da resposta imune do hospedeiro. O paciente infectado pode apresentar desde formas localizadas como LCL e LCM, até formas com comprometimento predominantemente sistêmico representado pela leishmaniose visceral (LV), causada nas Américas pela *L. (L.)*

chagasi. Simplisticamente, a leishmaniose se comporta como uma doença bipolar: a LCL cura-se espontaneamente e está associada à presença de células T antígeno específicas, enquanto que a LCD pode não apresentar adequadamente estas células, representando um pólo anérgico, e a LCM apresenta uma resposta exacerbada destas células T, num pólo hiperérgico. Formas subpolares com características que não se adequam a nenhum destes extremos são descritas. (GRIMALDI & TESH, 1993; GREVELINK & LERNER, 1996).

Em áreas endêmicas, o diagnóstico de LCL e LCM é feito muitas vezes baseado apenas em dados clínicos associados ao teste intradérmico de Montenegro (REED, 1996). Ainda que muitas técnicas diagnósticas tenham sido desenvolvidas, como imunodiagnóstico e métodos de biologia molecular, o padrão ouro continua sendo a demonstração do parasita em amostras de tecido corado, ou seu crescimento em cultura (WEIGLE et al., 2002).

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* também pode ser feita, através das técnicas de fixação de complemento (FC), aglutinação direta (DAT), ensaio imunoenzimático (ELISA), ou imunofluorescência indireta (IFA). Entretanto, a positividade destes testes é afetada pela forma de doença e tempo de evolução da mesma, instituição de terapêutica específica, assim como da técnica adotada, não sendo utilizados rotineiramente para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar (BERMAN, 1997).

Os métodos descritos, clássicos no diagnóstico de leishmaniose tegumentar, sofrem limitações por utilizarem tecidos, necessitarem de repetidas amostras para aumentar a sensibilidade, e por apresentarem características subjetivas uma vez que a

positividade está intrinsecamente ligada à experiência do examinador, o que geralmente ocorre apenas em áreas de maior endemicidade .

O estudo histopatológico do material obtido das lesões deve ser avaliado cuidadosamente quanto à presença de formas amastigotas de *Leishmania* e alterações histológicas decorrentes da doença. Estas consistem basicamente em infiltrado inflamatório mononuclear misto e formação de granulomas, com características inespecíficas e dependentes da forma e fase de evolução da LTA. A histopatologia isoladamente não propicia o diagnóstico da doença, exceto quando identificamos formas amastigotas intracitoplasmáticas (SOTTO et al., 1989; MARZOCHI et al., 1999; RASO & GENARO, 2000). A utilização de técnicas de imunohistoquímica torna possível a identificação do antígeno do agente etiológico mesmo quando há escassez do mesmo no tecido estudado (SOTTO et al., 1989; AMATO et al., 1998; RASO & GENARO, 2000).

A identificação da espécie do parasita é importante para o diagnóstico da doença, estando relacionada a diferenças na virulência e patogenicidade do agente, o que pode interferir na avaliação terapêutica e prognóstica, assim como nos métodos de controle da doença (GRIMALDI et al., 1987; GRIMALDI & TESH, 1993; DEGRAVE et al., 1994; GREVELINK & LERNER, 1996; ANDRADE et al., 2001). Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para a diferenciação de espécies de *Leishmania*, como a análise molecular e a utilização de anticorpos monoclonais. Esta última apresenta limitações relacionadas à dificuldade em diferenciar o agente de debris de tecido do hospedeiro, necessitando de observador bastante treinado (BERMAN, 1997).

A análise molecular do ácido desoxirribonucleico (DNA) do parasita por técnicas de hibridização "in situ" e reação em cadeia de polimerase (PCR) permite a identificação das espécies envolvidas, tanto em tecido fresco, quanto em cultura e material conservado em parafina ou outras soluções. Sua sensibilidade pode chegar a 92% (AVILES et al., 1999) e 100% (BELLI et al., 1998), com especificidade de 100% (AVILES et al., 1999; BELLI et al., 1998), ambas variando na dependência do “primer” utilizado, da experiência de quem realiza o exame, e de condições adequadas do laboratório a fim de evitar contaminação (DEGRAVE et al., 1994). Assim, embora mais rápida do que métodos de cultura, a PCR apresenta problema de praticidade e custo, além do fato de que também aqui o padrão ouro usual continua sendo baseado em técnicas parasitológicas de identificação do agente.

Apesar de milenar, a leishmaniose tegumentar ainda é uma doença com questões cruciais a serem respondidas. Um dos principais desafios a serem resolvidos é a questão da precisão diagnóstica, especialmente na identificação de espécies que ocorrem em determinadas regiões, relacionadas com formas peculiares da doença. A evolução do conhecimento em técnicas que viabilizem este tipo de propedêutica tornará factíveis avaliações terapêuticas, prognósticas e profiláticas, como desenvolvimento de vacinas eficazes. Poderá possibilitar ainda um melhor conhecimento da história natural da leishmaniose, e até mesmo uma reavaliação de classificações taxonômicas vigentes.

1.1 SITUAÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Espírito Santo é um Estado da Região Sudeste com área territorial de 46.184,1 km², fazendo divisa com a Bahia ao norte, oceano Atlântico ao leste, Minas Gerais ao oeste, e Rio de Janeiro ao sul (Figura 1). Conta com uma população de

3.093.171 habitantes e densidade demográfica de 63,62 habitantes/Km² (IBGE/2000). Possui 77 municípios distribuídos em 12 regiões, tendo sua capital, Vitória, situada na Região da Grande Vitória. Esta macro-região engloba os municípios de Vitória, Vila Velha, Serra, Viana, Cariacica, Fundão e Guarapari (Figura 2), com uma população total de aproximadamente 1.424.736 habitantes (Instituto de Apoio à Pesquisa e Desenvolvimento - IPES, 2002).

Os primeiros casos de leishmaniose tegumentar foram registrados no Estado por Cunha e Carini em 1912 (BARROS et al., 1985). Desde então, o Espírito Santo tem notificado uma média de 400 casos/ano (Fundação Nacional de Saúde - FUNASA, 2002). Em 1993 e 1999 foram notificados 893 e 884 casos, respectivamente, distribuídos por todas as 12 Regiões, as maiores incidências desde 1980. Somente os municípios de Cariacica, Viana, e Guarapari, os quais guardam grande proximidade com a capital do Estado, contribuíram com 105 casos no ano de 1999, 12% de todos os casos do Estado neste período. Segundo série histórica da FUNASA (2002), de 1980 a 2001 cerca de 9.121 casos foram reportados. Dados atualizados apontam notificação de 474 casos de LT no Estado de janeiro de 2001 a julho de 2002, sendo 469 formas cutâneas e 5 mucosas (Vigilância Ambiental da Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo, 2003).

Figura 1 - Mapa do Estado do Espírito Santo com identificação de suas divisas e Regiões administrativas

FONTE: Secretaria de Planejamento (SEPLAN), IPES

Figura 2 - Mapa da Região Metropolitana da Grande Vitória, Espírito Santo

FONTE: SEPLAN, IPES

Nos municípios da Grande Vitória a doença não se reveste de características puramente profissionais. A devastação da mata primitiva e sua substituição pelo bananal, em meio do qual os habitantes freqüentemente constroem suas casas, parece ter criado um ambiente favorável ao desenvolvimento de uma fauna de mamíferos e flebotomíneos. A existência prévia da reserva florestal de Duas Bocas no município de Cariacica parece ter funcionado como centro de difusão do parasito, e a manutenção de uma enzootia pelos cães domésticos, com o estabelecimento de uma transmissão no peri e intradomicílio, tem permitido a transmissão ao homem (SESSA et al., 1985).

Em estudos clínicos e epidemiológicos de pacientes diagnosticados com LC na região, intradermorreação de Montenegro resultou positiva em 92,6% (SESSA et al., 1991) a 96,6% (DEPS, 1998). No último estudo, exame histopatológico permitiu visualização de amastigotas em 78% dos casos (DEPS, 1998). Esfregaço de lesão para pesquisa do parasita tem sido o principal exame responsável pelo diagnóstico da doença no Estado, com positividade citada de 76,9% (BARROS et al., 1985) a 98,5% (DEPS, 1998). Estudo realizado nos municípios de Viana e Cariacica identificou *Leishmania (V.) braziliensis* em amostras isoladas de 3 pacientes e 27 cães, através de inoculação em “hamster” (BARROS et al., 1985). Em outro estudo a presença do mesmo subgênero e espécie do parasita foi demonstrada por anticorpos monoclonais de amostras cultivadas em meio de Novy-McNeal-Nicolle (NNN) de 17,2% dos cães avaliados nesta área, reforçando a prevalência da *Leishmania (V.) braziliensis*, e ressaltando a importante participação deste animal doméstico no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar na região (FALQUETO et al., 1986).

O Estado do Espírito Santo apresenta regiões que vêm mantendo níveis

endêmicos de leishmaniose tegumentar, com importantes publicações científicas a respeito desta doença (BARROS et al., 1985; SESSA et al., 1985; FALQUETO et al., 1986; FALQUETO et al., 1991; FALQUETO et al., 1993; FALQUETO, 1995; SESSA et al., 1991; SESSA et al., 1994; DEPS, 1998). Entretanto, poucos estudos (BARROS et al., 1985; BRAHIM, 1999) foram realizados objetivando identificar espécies de *Leishmania* responsáveis pelos casos de LT nesta região, o que justifica nossa proposta em trabalhar com uma técnica de identificação do gênero e espécie do parasita em amostras de tecido, utilizando a técnica de PCR.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL:

Estudar a leishmaniose cutânea em pacientes do Estado do Espírito Santo, Brasil, utilizando métodos de diagnóstico molecular que possibilitem caracterizar o gênero, subgênero e a espécie de *Leishmania* envolvida na doença nesta região.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar a eficiência da técnica de PCR no diagnóstico de leishmaniose cutânea, utilizando amostras de tecidos estocados em parafina, e em formol obtidas de pacientes do Estado do Espírito Santo, Brasil;
2. Procurar identificar perfis desta reação que permitam determinar a espécie da *Leishmania* responsável por casos de leishmaniose cutânea no Estado do Espírito Santo, Brasil;
3. Comparar os resultados obtidos entre as várias técnicas empregadas em tecidos incluídos em parafina e naqueles fixados em formol, no diagnóstico de leishmaniose cutânea no Estado do Espírito Santo, Brasil;

4. Comparação dos resultados acima com a pesquisa direta do agente, reação de Montenegro, e imunohistoquímica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O AGENTE ETIOLÓGICO

A *Leishmania* é um protozoário da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, e gênero *Leishmania*. Este parasita tem dois estágios distintos em seu ciclo de vida: um estágio flagelar móvel, promastigota, que vive extracelularmente no aparelho digestivo de flebotomíneos; e um estágio amastigota, imóvel, que reside dentro de macrófagos de vertebrados (GRIMALDI & TESH, 1993).

De maneira geral, a *Leishmania* possui uma única mitocôndria, o cinetoplasto, que contém uma substancial quantidade de DNA distribuído como mini-círculos e maxi-círculos (kDNA), e parece estar entre a mais altamente diversificada célula eucariótica conhecida (GRIMALDI & TESH, 1993).

Sua morfologia no hospedeiro humano e em outros mamíferos susceptíveis é tipicamente a forma amastigota (figura 3). Esta é constituída por um corpo oval ou arredondado, medindo de 2 a 5 micra de diâmetro, com membrana delgada e citoplasma que se cora em azul com os métodos de Leishman e Giemsa. Seu núcleo é arredondado e excêntrico, ocupa mais da metade do parasita, e se cora em vermelho púrpura. Possui ainda um axonema e um cinetoplasto, este em forma de bastonete ou de grânulo arredondado, que se localiza próximo ao núcleo e se cora em vermelho-violáceo (PEARSON et al., 2000).

Já no hospedeiro invertebrado, sua forma é denominada promastigota (figura 4) e apresenta corpo fusiforme, medindo de 10 a 15 micra de comprimento e 1,5 a

3,5 micra de largura, com cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo mais longo que o corpo (PEARSON et al., 2000; ASHFORD, 2000).

Figura 3 - Macrófago infectado com duas formas amastigotas de *Leishmania* coradas em H&E

FONTE: The Carlo Denegri Foundation. Atlas of medical parasitology

Figura 4: Forma promastigota de *Leishmania* corada com Giemsa

FONTE: The Carlo Denegri Foundation. Atlas of medical parasitology

Morfologicamente as espécies diferem entre si por variações no tamanho e diâmetro do cinetoplasto, posição do cinetoplasto e do núcleo, número e espaçamento dos microtúbulos subpeliculares das amastigotas e morfologia da faixa de DNA do cinetoplasto. Podem ainda se distinguir por características sorológicas (anticorpos monoclonais específicos), bioquímicas (densidade de flutuação do DNA nuclear e do cinetoplasto), e moleculares (reação em cadeia de polimerase, hibridização, análise eletroforética de produtos do DNA do cinetoplasto clivados por enzimas de restrição) (GRIMALDI & TESH, 1993; FERNANDES et al., 1994; DA CRUZ & AZEREDO-COUTINHO, 2001). Tentativas de diferenciar as espécies baseadas em diferenças de comportamento em meio de cultura e em inoculação em animais são falhas, pois têm se mostrado ligado mais às características do próprio meio de cultura, e ao estado imunológico do animal utilizado (NAVIN et al., 1990; WEIGLE et al., 1987). Outra maneira utilizada para distinguir cepas e espécies de *Leishmania* é a verificação do padrão de localização do desenvolvimento da *Leishmania* no tubo digestivo do flebotomíneo, região peripilária ou suprapilária (GRIMALDI & TESH, 1993; FERNANDES et al., 1994; DA CRUZ & AZEREDO-COUTINHO, 2001).

Segundo LAINSON & SHAW (1987), as espécies de *Leishmania* nas Américas pertencem a dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Estes se subdividem em várias espécies, sendo que aquelas mais freqüentemente relacionadas à leishmaniose tegumentar no Brasil são a *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (Quadro 1).

Quadro 1 - Distribuição de espécies de *Leishmania* que causam doença nas Américas

GÊNERO	SUBGÊNERO	ESPÉCIES
<i>Leishmania sp</i>	<i>L. Viannia</i>	<i>L. V. braziliensis</i>
		<i>L. V. peruviana</i>
		<i>L. V. guyanensis</i>
		<i>L. V. panamensis</i>
		<i>L. V. lainsoni</i>
		<i>L. V. naiffi</i>
		<i>L. V. colombiensis</i>
		<i>L. V. shawii</i>
	<i>L. Leishmania</i>	<i>L. L. mexicana (pifanoi)</i>
		<i>L. L. amazonensis (garnhami)</i>
		<i>L. L. venezuelensis</i>
		<i>L. L. chagasi (infantum)</i>

FONTE: Adaptação de LAINSON & SHAW (1987); GRIMALDI et al., 1989; GRIMALDI & TESH, 1993.

L. (V.) braziliensis causa lesões cutâneas e/ou mucosas, geralmente agressivas, e que podem recorrer após tratamento e cura (PASSOS et al., 1999; ANDRADE et al., 2001). A *L. (V.) guyanensis* causa predominantemente lesões cutâneas, enquanto as outras espécies de *L. Viannia* encontradas no Brasil raramente são encontradas em humanos. O único parasita do subgênero *Leishmania* que causa lesões cutâneas no Brasil é a *L. (L.) amazonensis*, sendo esta forma menos severa e tendendo a cura espontânea (PASSOS et al., 1999). Menos frequentemente esta

espécie pode ser responsável por casos de doença mucosa ou cutânea difusa (BARRAL et al., 1991).

O estudo taxonômico realizado por LAINSON & SHAW (1987) baseou-se em critérios como a localização no tubo digestivo do flebotômíneo onde o parasita se desenvolve e seu comportamento em meio de cultura e modelos experimentais. Entretanto, estudos adicionais caracterizando e identificando as diferentes espécies ainda são necessários. Diversos métodos imunológicos e bioquímicos na caracterização molecular de *Leishmania* têm sido aplicados nas revisões taxonômicas, como: eletroforese de isoenzimas, anticorpos monoclonais, mapas de restrição de DNA do cinetoplasto (kDNA), hibridização com kDNA total ou sondas de mini-círculos, marcadores de DNA cromossomal e análise de cariótipo (FERNANDES et al., 1994).

A leishmaniose tegumentar é causada por um grupo de espécies de *Leishmania* relacionadas geneticamente, cada qual com manifestações clínicas mais freqüentes e áreas geográficas de maior endemicidade. A pronta identificação destas espécies é considerada crucial devido às diferenças na virulência e tipo de resposta a esquema terapêutico entre as mesmas, podendo auxiliar na avaliação prognóstica, e fundamentar estudos epidemiológicos e biológicos (GRIMALDI & TESH, 1993; FERNANDES et al., 1994; MIMORI et al., 1998). Entretanto, nenhuma das manifestações clínicas é única a uma espécie em particular, e diferentes espécies podem ocasionar formas semelhantes de doença, principalmente sob influência de fatores relacionados à resposta do hospedeiro na expressão da doença (WEIGLE & SARAVIA, 1996).

2.2 CICLO BIOLÓGICO E PATOGENIA

Nas Américas, a *Leishmania* pode ser transmitida pela picada das fêmeas de diversas espécies de flebotomíneos (*Diptera*, *Psychodidae*, *Phlebotominae*) do gênero *Lutzomyia* (ASHFORD, 2000). No Brasil, os principais vetores incriminados neste processo de transmissão são a *Lu. wellcomei*, predominante na região da Bacia Amazônica, a *Lu. whitmani*, encontrada no nordeste e centro-oeste, e a *Lu. intermedia*, comum nas Regiões Sudeste e Sul (BRAHIM, 1999).

Quatro a sete dias após o repasto infectante de formas amastigotas de *Leishmania* pelo vetor, estas se transformam em promastigotas e migram para as partes anteriores do tubo digestivo do inseto, atingindo o aparelho sugador, probóscida. Ao picar um animal susceptível, há inoculação das formas promastigotas que são fagocitadas por macrófagos do hospedeiro vertebrado. Neste se transformam em amastigotas, multiplicando-se por divisão binária dentro dos vacúolos parasitóforos. A célula parasitada se multiplica dividindo com as células filhas os parasitas, podendo ainda se romper liberando formas amastigotas que por sua vez serão novamente fagocitadas por células macrofágicas, e estas posteriormente se multiplicarão ou se romperão. Novo flebotomíneo poderá ingerir macrófagos infectados, e o ciclo se perpetua (SAMADY et al., 1996; ASHFORD, 2000; PEARSON et al., 2000; RASO & GENARO, 2000; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2002). O ciclo biológico da LTA encontra-se representado na figura 5.

Na pele, promastigotas são inoculadas juntamente com a saliva do vetor flebotomíneo, a qual contém uma substância denominada maxadilan com função de facilitar a sucção, e que parece estar implicada no aumento da virulência do parasita (GRIMALDI & TESH, 1993; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2002). Estudos

experimentais têm mostrado que a presença da saliva do flebotomíneo proporciona lesões exacerbadas de leishmaniose cutânea por inibir algumas das funções dos macrófagos do hospedeiro (ZER et al., 2001). Posteriormente, promastigotas perdem o flagelo e são transformadas em amastigotas nos vacúolos intracitoplasmáticos de macrófagos, onde se replicam. Neste local, a *Leishmania* induz a produção macrofágica de fator de necrose tumoral- α (TNF α), o qual potencializa a ação de interferon- γ (IFN γ) e promove a ativação macrofágica. Induz também a produção de fator transformador de crescimento celular- β (TGF β), o qual está relacionado à desativação do macrófago e inibição de IFN γ (BITTENCOURT et al., 1996).

Figura 5 - Ciclo biológico da leishmaniose tegumentar americana

FONTE: Adaptação do Atlas of medical parasitology . The Carlo Denegri Foundation.

A sobrevivência inicial da *Leishmania* dentro do macrófago irá depender criticamente de qual destas citocinas predomina no micro-ambiente da infecção, o que resulta no achado final de macrófagos não adequadamente ativados contendo amastigotas, a eliminação do agente (BITTENCOURT et al., 1996), ou sua persistência dentro de células macrofágicas (AMATO et al., 1998). As células de Langerhans e os keratinócitos, também foram implicados na modulação da resposta imune celular na leishmaniose (BITTENCOURT et al., 1996).

No homem, a manifestação clínica da leishmaniose resulta de um desequilíbrio na relação parasita/hospedeiro, estando intimamente relacionada aos mecanismos de defesa do último. Já nos reservatórios animais parece haver uma relativa adaptação imunológica, traduzindo-se geralmente em doença autolimitada ou inaparente. Muitas formas de leishmaniose são consideradas zoonóticas, onde animais silvestres e domésticos são reconhecidos como reservatórios, sendo o homem considerado um hospedeiro secundário e acidental. Entretanto, nas formas antroponóticas, acredita-se que os humanos são os principais reservatórios desta doença (DESJEUX, 1996).

2.3 IMUNOLOGIA

Na LTA, a evolução de infecção para doença depende da interação entre fatores ligados às características genéticas e à imunidade do hospedeiro, predominantemente mediada por células, e virulência da espécie de *Leishmania* envolvida (MORIEARTY, et al., 1978; BARRAL et al., 1995; SILVEIRA, et al., 1998). A resposta humoral não desempenha papel relevante na imunopatologia da doença, e os anticorpos não apresentam função protetora durante a infecção natural,

podendo altos títulos estar relacionados com infecção crônica, e baixos títulos com infecção curada (SCOTT, 1990).

Desta forma, a leishmaniose se apresenta como doença espectral, ou seja, clinicamente se traduz com manifestações que vão de um pólo anérgico a um pólo hiperérgico de resposta imune, com um vasto desdobramento de formas intermediárias que se desenham entre estes extremos de apresentação. O primeiro é representado pela leishmaniose cutânea difusa (LCD), com lesões ricas em parasitas, e tendência à disseminação e cronicidade. Severa depressão imunológica é característica desta forma de doença, traduzida por resposta celular pouco efetiva com teste de Montenegro negativo e resposta pobre à terapêutica. Na outra extremidade do espectro está a leishmaniose cutânea recidivante, com lesões pobres em parasitas e resposta celular intensa, traduzida por exacerbação do teste de Montenegro (MORIEARTY, et al., 1978; CARVALHO et al., 1994; PEARSON et al., 2000; RASO & GENARO, 2000).

Tanto os linfócitos CD4+ quanto CD8 + estão envolvidos na imunologia da leishmaniose cutânea (LIMA et al., 1994). Os hospedeiros podem expressar perfis do tipo T-helper 1 (TH1 - ativação de macrófagos e destruição parasitária) e tipo TH2 (inibição da ativação de macrófagos), produzindo, então, citocinas tipo 1, interferon gama (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), e fator de necrose tumoral (TNF), as quais têm funções estimuladoras da resposta imune mediada por células; e citocinas do tipo 2, interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), e interleucina 10 (IL-10), com funções inibidoras (SCOTT, 1990; MCSORLEY, 1996; MARZOCHI et al., 1999).

Indivíduos que se expõem à infecção e apresentam lesões localizadas, frustras, ou não desenvolvem doença, apresentam uma resposta predominante do tipo TH1. Por outro lado, outros indivíduos evoluem com várias formas de apresentação de LTA, de lesões localizadas e benignas a lesões disseminadas ou com acometimento de mucosas, expressando o espectro de uma resposta mista, TH1 e TH2. Formas com grande destruição tecidual estão geralmente relacionadas a uma resposta imune celular exacerbada com grande produção de IFN- γ e IL4 (UYEMURA et al., 1993; WEIGLE & SARAVIA, 1996; BERMAN, 1997; KHARAZMI et al., 1999). As formas de leishmaniose cutânea que se apresentam como LCD resultam de uma depressão da imunidade celular, permitindo uma proliferação intra-macrofágica descontrolada do parasita, com títulos de imunoglobulina G (IgG) extremamente elevados, o que provavelmente traduz o predomínio de resposta de tipo TH2 (BARRAL et al., 1995; MARZOCHI et al., 1999; DA CRUZ & AZEREDO-COUTINHO, 2001).

A própria *Leishmania* também desempenha importante papel na definição da evolução desta doença. Embora existam múltiplos fatores relacionados aos componentes de defesa do sistema imune celular do hospedeiro, o parasita por si só desempenha mecanismos de escape para estes sistemas. Tais mecanismos são baseados em estratégias para evadir-se dos componentes citotóxicos séricos, sobrevivência intramacrofágica, e modulação da resposta imune ligada às células T, esta amplamente discutida acima.

A resistência sérica de promastigotas, injetadas na fase inicial da infecção, não é causada por sua falha em ligar-se a receptores e ativar complemento, mas parece estar ligada à expressão de antígenos de superfície reguladores. Este tipo de

resistência apresenta variações espécie-específicas, contribuindo para diferenças na severidade da apresentação da doença (BOGDAN et al., 1990). Outro fator associado a mecanismos de evasão nesta fase da infecção é o efeito da saliva do flebotômio, que parece contribuir para uma maior resistência das promastigotas no soro através de um efeito inibitório na habilidade do macrófago apresentar antígenos do parasita aos linfócitos T, redução na produção de óxido nítrico, e incrementação na secreção de IL-4 por linfócitos T (BOGDAN et al., 1990; GRIMALDI & TESH, 1993; ZER et al., 2001; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2002).

Para sobreviver dentro dos macrófagos, a *Leishmania* é capaz de promover diversas estratégias: provoca um fenômeno de inibição do mecanismo de morte oxigênio-dependente de macrófagos ativados; libera substâncias que neutralizam ou eliminam metabólitos oxidativos; inativa enzimas lisossômicas através da ação de receptores de superfície como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína com peso molecular de 63kDa (gp63); mantém um pH neutro dentro do fagolisossoma e, na fase inicial da doença, invade os macrófagos da pele que são submetidos a uma temperatura de aproximadamente 30 a 35°, o que diminui intrinsecamente sua capacidade de lisar este parasita (BOGDAN, 1990; WEIGLE & SARAVIA, 1996, RITTIG & BOGDAN, 2000). Adicionalmente, promastigotas têm demonstrado capacidade de entrar em outras células que não fagócitos mononucleares, com reduzida capacidade de matar este parasita, e nelas se transformar em amastigotas e proliferar, o que contribuiria para uma prolongada sobrevivência (RITTIG & BOGDAN, 2000).

Ainda com relação ao papel da *Leishmania* na imunopatologia da LC, diferentes espécies são responsáveis por evolução e prognóstico diversos (SCOTT,

1990; RASO & GENARO, 2000; DA CRUZ & AZEREDO-COUTINHO, 2001). Assim, *L. (L.) amazonensis*, e *L. (V.) braziliensis* apresentam padrões de transmissão, vetores e reservatórios distintos. Os antígenos de *L. (V.) braziliensis* parecem ser mais potentes estimuladores de resposta celular do que aqueles de *L. (L.) amazonensis*, o que se traduz em resposta celular hiperativa com teste de Montenegro forte reator na doença causada pela primeira, e resposta imune celular deprimida podendo resultar em tempo de evolução para cura mais longo e formas cutâneas difusas na segunda (SILVEIRA, F.T. et al., 1999).

Por outro lado, não existe qualquer estudo que explique claramente porque alguns pacientes progridem de formas cutâneas simples para formas mucosas. VALLI et al. (1999), utilizando técnica de imunomarcção, demonstraram que determinados padrões sorológicos podem predizer a ocorrência tardia de formas mucosas, sugerindo que investigações sorológicas poderiam auxiliar no diagnóstico e entendimento da imunopatologia da LC e LM. Entretanto, estes resultados não têm sido reproduzidos, e esta é uma questão ainda não resolvida.

Sinteticamente, a resistência do hospedeiro está associada com ativação seletiva e diferenciação de células T “helper” efetivas numa resposta tipo TH1, caracterizada por um padrão distinto de secreção de citocinas, principalmente IFN γ e IL2. Infecções progressivas e formas mais agressivas são correlacionadas com ativação de linfócitos T CD4⁺ com resposta do tipo TH2, os quais expressam IL4, IL5, IL10, entre outras. Os mecanismos levando a um ou outro tipo de resposta, ainda se encontram sob investigação. Entretanto, evidências sugerem diversos fatores que parecem afetar este processo: o ambiente de citocinas durante os eventos iniciais, a interação com células apresentadoras de antígeno regionais, influência de sinais co-

estimuladores, e fatores ligados diretamente ao agente etiológico (GRIMALDI & TESH, 1993). Os aspectos da interação entre a *Leishmania* e as células de seu hospedeiro são muito complexos, e métodos microscópicos associados a técnicas de biologia molecular poderão ser complementarmente úteis no melhor entendimento deste enfoque da doença (RITTIG & BOGDAN, 2000).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária com manifestações clínicas multifacetadas, apresentando-se com formas cutâneas, cutâneo-mucosas e visceral, com grande diversidade epidemiológica. Difunde-se do sudeste do Texas ao nordeste da Argentina e Ilhas do Caribe, e sua distribuição geográfica é limitada pela distribuição do vetor, flebotomíneo, e sua susceptibilidade a climas frios com melhor adaptação a clima tropical e subtropical (DESJEUX, 1996; WEIGLE & SARAIVA, 1996).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO, 2002), a leishmaniose é endêmica em 88 países nos cinco continentes, sendo uma ameaça para cerca de 350 milhões de pessoas no mundo. Estima-se que 12 milhões de pessoas no mundo apresentam forma inaparente de infecção ou alguma forma clínica de leishmaniose, e que de 1,5 a 2 milhões de casos novos que ocorrem anualmente, apenas 600.000 são oficialmente notificados. Dentre os casos novos, cerca de 500.000 são reportados como LV e 1-1,5 milhões de LTA (DESJEUX, 1996). Noventa por cento (90%) de todos os casos de LCM ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru, e 90% de todos os casos de LC no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia

Saudita e Síria (RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2002; WHO, 2002), como representado na Figura 6.

No Brasil, casos de leishmaniose são notificados por todas as regiões geográficas, com predomínio do Nordeste e Norte, seguidos pelo Centro-Oeste, Sudeste e Sul, este com menor prevalência. Segundo série histórica da FUNASA (2002), o número de casos confirmados de LT de 1980 a 2001 foi de 490.606 casos (Figura 7). No período de 1985 a 2001, a LT vem apresentando coeficientes de detecção entre 10,45 a 21,23 por 100.000 habitantes, com tendência ao crescimento e expansão para novos municípios. A região Nordeste vem contribuindo com o maior número de casos (38,8%), e a região Norte com os coeficientes mais elevados (93,84/100.000 habitantes).

Figura 6 - Mapa do mundo ressaltando os países com maior incidência de leishmaniose cutânea

FONTE: WHO, 2002

Nesta mesma série histórica (FUNASA, 2002), a região Sudeste contribuiu com 47.797 casos (9,7%), sendo que o Estado do Espírito Santo registrou 9.121 casos (19%), precedido apenas pelo Estado de Minas Gerais, este com 28.271 casos (59%). Segundo relatório de registro da Vigilância Ambiental da Secretaria de

Estado da Saúde do Espírito Santo, 474 casos novos de LTA foram reportados de janeiro de 2001 a junho de 2002, sendo 474 LC e 5 LM. Dois Municípios da região Metropolitana da Grande Vitória, Viana e Cariacica, têm persistido como áreas de grande endemicidade, contando com aproximadamente metade de todos os casos cumulativos notificados no Estado. Trata-se de região de clima úmido, situada entre vales e montanhas, com altitude variando de 50 a 200m acima do nível do mar, com casas construídas no interior de plantações de banana e outras árvores frutíferas, ambiente bastante favorável à sobrevivência de flebotomíneos (BARROS, et al., 1985; FALQUETO et al., 1993).

Figura 7 - Número de casos confirmados de leishmaniose tegumentar americana no Brasil de 1980 a 2001

FONTE: FUNASA, 2002

A prevalência da leishmaniose no mundo é baseada em notificação e publicação de casos. No Brasil, embora seja considerada doença de notificação compulsória, muitas vezes é negligenciada e está claro que os dados oficiais são grosseiramente subestimados. As principais causas de subnotificação são: distribuição descontínua de áreas endêmicas, casos não diagnosticados, detecção passiva de casos, percentual de casos oligo ou assintomáticos, e erros diagnósticos.

Estes ocorrem principalmente por dificuldade de acesso a cuidados médicos, capacidade de diagnóstico escassa ou ausente, e disponibilidade variável de drogas terapêuticas (DESJEUX, 1996).

Historicamente, nas décadas de 30 e 40 ocorreu no Brasil um intenso desmatamento em decorrência da agricultura e construção de estradas, e a transmissão da *Leishmania* nesta época estava mais associada à entrada do hospedeiro humano em áreas silvestres, com importante papel dos vetores e reservatórios também silvestres (KLAUS et al., 1999). Atualmente, mudanças no comportamento epidemiológico da LT têm ocorrido. Esta se apresenta como uma doença espectral também do ponto de vista epidemiológico, variando de doença silvestre, rural a periurbana. A doença tem sido descrita em regiões de encostas nas periferias de grandes centros, com transmissão relacionada aos flebotomíneos de hábitos domiciliares e peridomiciliares, assim como a reservatórios domésticos, principalmente cães (DA-CRUZ & AZEREDO COUTINHO, 2001). Inicialmente considerada zoonose de animais silvestres que acometia pessoas que entravam diretamente em contato com florestas, passa a existir em zonas rurais já desmatadas, e em regiões periurbanas. Desta forma, nota-se coexistência de um duplo perfil epidemiológico: manutenção de focos endêmicos antigos ou de áreas de sua proximidade, e aparecimento de surtos epidêmicos associados a fatores socioeconômicos com criação de ambientes altamente favoráveis à transmissão da doença (FALQUETO & SESSA, 1991; KLAUS et al., 1999). Migração de pessoas de áreas de baixo risco de transmissão para regiões endêmicas, por razões ocupacionais ou outras, crescimento rápido não planejado e urbanização de áreas rurais onde o ciclo zoonótico ocorre, deterioração de condições sócio-econômicas

com migrações em massa e possibilidade de surtos, alterações ambientais feitas pelo homem, redução ou suspensão de campanhas contra a malária, todos são fatores de risco para a expansão da leishmaniose (KLAUS et al., 1999).

Nas Américas pelo menos 40 mamíferos silvestres, geralmente roedores e marsupiais, já foram encontrados parasitados por *Leishmania*, alguns considerados reservatórios naturais do parasita. (FALQUETO & SESSA, 1991). A aptidão para que sejam considerados reservatórios depende da sua densidade populacional, duração da infecção, localização do parasita dentro do animal, e seu estado imunológico. Assim, o termo reservatório deve ser restrito às espécies de animais nos quais o parasita sobrevive em equilíbrio indefinidamente (ASHFORD, 1996). A relação entre o parasita e seu hospedeiro é complexa. Em ciclos zoonóticos, a doença envolve apenas a *Leishmania*, o flebotomíneo, e o reservatório, sendo considerada auto-sustentável. Em ciclos antroponóticos, o homem participa muitas vezes como hospedeiro acidental, doente ou não. Para que o reservatório desempenhe papel importante na transmissão e manutenção da doença, este deve ter contato intenso com o flebotomíneo, ter uma densidade populacional alta, a duração da infecção deve ser longa e relativamente não patogênica, e os parasitas identificados no animal devem ser indistinguíveis daquele encontrados nos humanos acometidos pela doença (KLAUS et al., 1999; SALIBA & OUMEISH, 1999; ASHFORD, 1996). Vários autores têm incriminado o cão como reservatório de LT em áreas peridomiciliares e domiciliares (BARROS et al., 1985; FALQUETO et al., 1986; FALQUETO et al., 1991; FALQUETO et al., 1993; SESSA et al., 1994; BRAHIM, 1999; REITHINGER & DAVIES, 1999; SALIBA & OUMEISH, 1999; SILVEIRA, T.G.V. et al., 1999; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2002). Nos cães a doença é

caracterizada pela presença de lesões cutâneas e/ou mucosas únicas ou múltiplas, ulceradas, vegetantes ou crostosas, com parasitismo mantido durante toda sua vida, o que levanta importantes questões sobre sua importância epidemiológica no ciclo da doença. Quanto ao homem, diversos autores têm comprovado a permanência do parasita ou de seus antígenos em cicatrizes de lesões curadas (AMATO et al., 1998; SOTTO et al., 1989), podendo funcionar como fonte de infecção, ressaltando a importância de seu papel na manutenção e distribuição da LTA devido à longevidade do ser humano e ao seu grande poder de deslocamento (WEIGLE et al., 1993; DESJEUX, 1996; WEIGLE & SARAVIA, 1996).

No ciclo biológico da leishmaniose o parasita freqüentemente circula entre os hospedeiros animais na natureza, sendo transmitido através da picada de um inseto infectado. Somente fêmeas adultas agem como vetores, porque são hematófagas e antropofílicas. Este vetor é um flebotomíneo da família *Psychodidae*. No Brasil, o gênero *Lutzomyia*, é responsável por esta transmissão. Sua distribuição se sobrepõe com a distribuição dos reservatórios, e seu desenvolvimento se dá principalmente nos meses mais quentes e úmidos (FALQUETO & SESSA, 1991; KLAUS et al., 1999; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2002). Os flebotomíneos tendem a permanecer próximos ao ambiente de sua alimentação, pois são “voadores” pobres, cobrindo somente curtas distâncias no tempo, a uma altitude ao redor de dois metros (PEARSON et al., 2000; SAMADY et al., 1996). No Espírito Santo, características regionais levam à suposição de que *Lutzomyia intermedia* é a espécie predominante (SESSA et al., 1985; FALQUETO et al., 1993), estando implicada na transmissão da doença neste Estado.

A *L. (V.) braziliensis* é a espécie mais encontrada em nosso país (GRIMALDI et al., 1987, GRIMALDI et al., 1989), estando distribuída por todo território nacional, principalmente no Nordeste e Sudeste. No Espírito Santo, a *L. (V.) braziliensis* tem sido descrita como espécie predominante (GRIMALDI et al., 1987; BRAHIM, 1999). Também são responsáveis pela LTA no Brasil a *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, e mais recentemente, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, e *L. (V.) shawi* (GRIMALDI & TESH 1993).

A *L. (V.) braziliensis* está associada a lesões cutâneas únicas ou múltiplas, mucosas, cutâneo-mucosas e ganglionares (WEIGLE & SARAVIA, 1996; MARZOCHI et al., 1999; RASO & GENARO, 2000; DA-CRUZ & AZEREDO COUTINHO, 2001). Seu principal reservatório silvestre não tem sido identificado claramente até o momento, mas os cães têm sido apontados como principais reservatórios em ciclos urbanos. A *L. (V.) guyanensis* está geralmente associada a lesões cutâneas múltiplas aglomeradas em uma única localização, com acometimento linfático regional, porém raro comprometimento mucoso. Encontrada ao norte do rio Amazonas, seus principais reservatórios são o Tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), o gambá (*Didelphis marsupialis*) e a Preguiça (*Choloepus didactylus*), sendo a infecção nestes animais usualmente inaparente. O homem parece ser um hospedeiro acidental (MARZOCHI et al., 1999).

Quanto à *L. (L.) amazonensis*, a única espécie do subgênero *Leishmania* que causa lesões cutâneas, resulta em LCL ou LCD. A LCL manifesta-se por lesões papulares ou ulceradas geralmente únicas e localizadas em membros inferiores. Já a LCD apresenta lesões nodulares difusas por toda pele, com intenso parasitismo e prognóstico ruim, acometendo principalmente indivíduos com resposta imune celular

inadequada. Na Bahia foram descritos casos de acometimento medular por esta espécie (BARRAL et al., 1991). É encontrada no Amazonas, Pará, Maranhão, Bahia, Minas Gerais, e Goiás, tendo sua baixa incidência causada pelo pobre hábito de antropofilia do seu principal vetor, *Lu. flaviscutellata*. Na Amazônia os reservatórios silvestres mais comuns são os marsupiais (*Didelphidae*) e roedores terrestres como o rato-espinho (*Proechimys guyanensis*) e o rato-de-arroz (*Oryzomys capito*), os quais apresentam infecção inaparente (MARZOCHI et al., 1999).

Todas as espécies de *Leishmania* podem causar LC, sendo que LM tem sido mais freqüentemente relacionada à *L. (V.) braziliensis* (GREVELINK & LERNER, 1996), podendo, entretanto, ser causada por *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, e ainda mais raramente por “subespécies” de *L. (L.) mexicana* (GRIMALDI & TESH, 1993). Além disso, em uma região específica, diversas espécies de *Leishmania* podem coexistir e serem transmitidas (WEIGLE & SARAVIA, 1996), ocasionando quadros clínicos também diversos em uma mesma área endêmica.

2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da leishmaniose tegumentar habitualmente é feito através de uma associação entre dados clínicos e epidemiológicos combinados a pelo menos um teste diagnóstico. Em algumas regiões endêmicas, principalmente naquelas em que o acesso até mesmo às técnicas de laboratório mais simples é dificultado, o diagnóstico é feito muitas vezes baseado apenas em dados clínicos, como: pequeno número de lesões em áreas corporais expostas, evolução arrastada, lesão usualmente indolor e não pruriginosa, e resistência a tratamentos não específicos para leishmaniose, sendo os pacientes tratados empiricamente na ausência de um diagnóstico mais específico

(GREVELINK & LERNER, 1996; REED, 1996). Entretanto, uma vez que as drogas disponíveis para terapêutica desta doença apresentam variáveis graus de toxicidade, não seria admissível tal prática na atualidade. Além do mais, outras doenças podem ter características endêmicas em uma mesma região geográfica, e o erro diagnóstico poderia ocasionar inclusive a morte.

2.5.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

As principais formas de apresentação da leishmaniose tegumentar, e as espécies geralmente a elas relacionadas, encontram-se resumidas no quadro 2.

Quadro 2 – Leishmaniose tegumentar na América: Classificação Clínica e espécies de *Leishmania*

Forma	Apresentação	Espécies
Leishmaniose Cutânea (LC)	Localizada (1)	<i>L.(V) braziliensis</i>
	Disseminada (2)	(1) (2) (4) (5) (6) (7)
	Difusa (3)	(8) (9) (10) (11)
	Recidivans (4)	<i>L.(V.) guyanensis</i> (1) (2) (9) (11)
Leishmaniose Mucosa (LM)	Tardia (5)	<i>L.(L.) amazonensis</i>
	Indeterminada (6)	(1) (3) (5) (7) (11)
	Primária (7)	<i>L. (V.) lainsoni</i>
Leishmaniose Mucocutânea (LMC)	Concomitante (8)	(1) (11)
	Contígua (9)	<i>L. (V.) naiffi</i>
Leishmaniose Ganglionar (LG)	Ganglionar Inicial (10)	(1) (11)
Forma Inaparente	Subclínica (11)	<i>L.(V.) shawi</i> (1) (11)

FONTE: adaptação de GREVELINK & LERNER, 1996; MARZOCHI et al., 1999

2.5.1.1 Leishmaniose Cutânea (LC)

No local da picada do flebotomíneo, após 2 a 16 semanas, surge uma lesão eritemato-papulosa bem delimitada que aumenta de tamanho, e posteriormente se ulcera. Pode ou não ocorrer linfadenite regional. A úlcera é indolor, geralmente arredondada, única ou múltipla, infiltrada e endurecida, com fundo eritematoso e granuloso. O fundo pode apresentar exsudato amarelado e crostas quando associado à infecção bacteriana. As bordas das lesões são elevadas e também eritematosas. A forma clássica conhecida como úlcera vulcânica ocorre em cerca de 50% das vezes (DOWLATI, 1996; GREVELINK & LERNER, 1996; SALMAN et al., 1999). Atipicamente pode apresentar-se como verrugas, nódulos hipodérmicos, lesões tuberosas ou pápulo-foliculares, assim como formas conhecidas como eczematosas, hiperqueratóticas, zosteriformes, erisipelóides, e esporotricóides, devendo ser feito diagnóstico diferencial com outras lesões cutâneas (quadro 3).

Quadro 3: Diagnóstico diferencial de leishmaniose cutânea (LC)

LC AGUDA		LC CRÔNICA E RECIDIVANTE
Tuberculose cutânea	Esporotricose	Lúpus vulgaris
Picada de inseto	Furúnculo	Lúpus eritematoso discóide
Molusco contagioso	Impetigo	Sarcoidose
Keratoacantoma	Verruga	Hanseníase
Paracoccidioidomicose	Sífilis	Sífilis
Granuloma piogênico	Linfoma	Psoríase
Carcinoma basocelular	Leucemia	Quelóide
Granuloma a corpo estranho	Metástases	Granulomatose de Wegener
Cromoblastomicose	Ectima	Granuloma facial
Úlcera de estase		Linfocitoma cutis

FONTE: adaptação de SALMAN et al., 1999; Ministério da Saúde/Brasil, 2000.

A localização das lesões geralmente depende do estilo de vida e vestimentas da população susceptível, ocorrendo preferencialmente em regiões expostas, como face e membros, e geralmente preservando o tronco (GREVELINK & LERNER, 1996; PEARSON et al., 2000).

A LC classifica-se como localizada, na mesma região da inoculação do agente etiológico; disseminada, numerosas e distantes da região de inoculação, sendo ocasionadas por disseminação hematogênica e/ou linfática; e difusa, muito grave e rara, considerada pólo anérgico, de evolução insidiosa com placas infiltradas, nodulares e extensas (MARZOCHI et al., 1999). Outra classificação define a LC como aguda, com menos de dois anos de evolução; crônica, mais que dois anos de evolução; recidivans, com nova pápula que surge ao redor de uma lesão antiga e aparentemente curada; ou difusa, de aspecto lepromatoso (DOWLATI, 1996).

Podem ocorrer recaídas após traumas em regiões diversas às anteriormente acometidas, recebendo o nome de fenômeno de Köbner (MARZOCHI et al., 1999).

Freqüentemente a LC evolui para cura espontânea em período variável, às vezes antes mesmo de haver ulceração clássica. No local se forma uma cicatriz geralmente lisa e brilhante, podendo passar despercebida. Mesmo quando tratadas, as lesões podem recidivar, permanecer indefinidamente curadas, ou evoluir para leishmaniose mucosa tardia. A forma difusa tende a cronicidade, nunca se cura espontaneamente, responde muito mal ao tratamento, e freqüentemente apresenta recaídas (GREVELINK & LERNER, 1996).

Os pacientes com LCL irão desenvolver formas cutâneo-mucosas em um percentual bastante variado, em média em torno de 3% (GREVELINK & LERNER, 1996; MARZOCHI et al., 1999), com relatos de até 34% em áreas endêmicas

(GREVELINK & LERNER, 1996), em um período descrito desde 2 a 40 anos após a cura da lesão cutânea inicial (GREVELINK & LERNER, 1996).

2.5.1.2 Leishmaniose Mucosa (LM)

Dentre os pacientes com LC que evoluem para LM, cerca de 50% ocorre dentro dos primeiros dois anos, e aproximadamente 90% em dez anos, esta última classificada como LM tardia (GREVELINK & LERNER, 1996; MARZOCHI et al., 1999, SILVEIRA, T.G.V. et al., 1999). No entanto, cerca de 8 a 16% dos casos de LM não apresentam história prévia de LC (WEIGLE & SARAVIA, 1996). Ainda não está definido o processo patogênico e os fatores desencadeadores desta evolução. Entretanto, alguns pacientes não apresentam cicatrizes ou história prévia de lesões cutâneas ou tratamentos, sendo esta forma denominada como lesões de origem indeterminada, com apresentação exclusiva de lesões mucosas. Descrevem-se ainda apresentações mucosas primárias, resultantes da inoculação direta do agente pela picada do vetor ou por contaminação direta, e manifestações cutâneas contíguas ou concomitantes.

A principal localização da LM é a mucosa nasal, estando presente quase sempre, mesmo quando outras regiões são acometidas (BRYCESON, 1996). A lesão nasal tem predomínio no septo anterior e paredes laterais, manifestando-se com obstrução nasal, coriza, epistaxe e crostas intranasais, sendo geralmente indolor. Pode ainda acometer palato, língua, faringe e laringe, levando, nestes casos, a sintomas como disfagia, odinofagia, tosse, rouquidão, e dispnéia (GREVELINK & LERNER, 1996; WEIGLE & SARAVIA, 1996; DA-CRUZ & AZEREDO COUTINHO, 2001).

A evolução da LM é progressiva e destrutiva, raramente ocorrendo cura espontânea. Geralmente deixa seqüelas físicas desfigurantes, com extensa destruição das cavidades nasal e faríngea. Conseqüentemente, pode evoluir com graves disfunções, como alteração da fala e da deglutição, ocasionando inclusive óbito por transtornos respiratórios (GREVELINK & LERNER, 1996; PEARSON et al., 2000; RASO & GENARO, 2000).

2.5.1.3 Leishmaniose ganglionar

A linfadenopatia pode ser o principal sinal, ou até a única manifestação de LC, precedendo a lesão cutânea em mais de dois terços dos casos, em média por duas semanas (MARZOCHI et al., 1999; RASO & GENARO, 2000), e documentada concomitantemente com úlcera clássica em 66% (MACHADO et al., 2002 apud BARRAL et al., 1992) a 85% (MACHADO et al., 2002) dos pacientes. Linfadenopatia regional, assim como linfangite nodular sem lesões tegumentares aparentes, têm sido descritas, sendo importante nestes casos considerar os diagnósticos de outras doenças como tuberculose, toxoplasmose, esporotricose, linfoma, neoplasias (WEIGLE & SARAVIA, 1996; RASO & GENARO, 2000). Embora esta apresentação seja considerada como uma manifestação inicial da doença, sua frequência e relevância não está determinada (MACHADO et al., 2002).

2.5.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Como discutido anteriormente, o diagnóstico de leishmaniose tegumentar tem sido frequentemente feito com base em dados clínicos e epidemiológicos, às vezes associados a algum teste laboratorial simples. Múltiplas técnicas diagnósticas

estão disponíveis, mas não existe um teste único que seja seguro isoladamente (SALMAN et al., 1999). Graves consequências podem decorrer de um diagnóstico tardio ou equivocado, sendo a precisão diagnóstica de fundamental importância. Assim, entendemos que o desenvolvimento de testes rápidos, facilmente realizáveis, baratos, sensíveis e específicos, é uma das prioridades no controle da leishmaniose.

2.5.2.1 Métodos Parasitológicos

Espécimes podem ser obtidos por escarificação da lesão, biópsia por “punch” ou biópsia em cunha, e ainda por aspiração com agulha fina. São então preparados em lâminas e corados com Giemsa para identificação de amastigotas dentro de macrófagos ou no espaço intercelular, podendo também ser utilizados para realização de culturas “in vitro” ou inoculação em animais.

Os métodos diretos de detecção têm a vantagem da simplicidade, porém necessitam de um observador treinado. A positividade do exame direto pode chegar a 98,5% em área de maior endemicidade (DEPS, 1998), principalmente em lesões recentes.

Positividade de culturas tem se mostrado em torno de 20% com utilização de três fragmentos de lesão em LC (BERMAN, 1997).

Idealmente, tanto exame direto quanto cultura deveriam ser realizados a fim de aumentar a possibilidade de confirmação diagnóstica.

2.5.2.1.1 Técnica para Coleta de Material

O material a ser examinado pode ser obtido através de escarificação com estilete na superfície da lesão; raspado com espátula ou lâmina de bisturi; punção aspirativa após injeção de solução salina; ou biópsia em cunha com lâmina de bisturi, sem que haja diferença no resultado final baseada na escolha do método de obtenção

da amostra (NAVIN et al., 1990). Biópsia de tecido pode ser utilizada para exame direto através de impressão por aposição em lâmina e para gerar material a ser estocado e examinado por várias metodologias.

Deve-se preferir as lesões mais recentes (MARZOCHI et al., 1999; SALMAN et al., 1999, Ministério da Saúde/Brasil, 2000; PEARSON et al., 2000), e o fato da lesão ser nova ou recidivante também influencia o resultado final (NAVIN et al., 1990).

Anti-sepsia deve ser realizada, independente da técnica de coleta empregada, a fim de evitar contaminação da amostra a ser obtida (MARZOCHI et al., 1999), não sendo evidenciada diferença entre os diferentes anti-sépticos utilizados (NAVIN, et al., 1990). O material que será utilizado para cultura quando obtido por punção aspirativa pode ser imediatamente inoculado, enquanto aquele obtido por biópsia deve ser mantido a 4° em solução salina com antibióticos por 24 horas antes de ser colocado no meio de cultura (Ministério da Saúde/Brasil, 2000). Deve-se atentar para o fato de que o uso de lidocaína em alta concentração para anestesia local no caso de realização de biópsias parece inibir crescimento de promastigotas, embora não se conheça com precisão a concentração mais adequada (NAVIN et al., 1990).

2.5.2.1.2 Pesquisa Direta

A pesquisa direta do parasita é um dos métodos mais tradicionais de diagnóstico da LC (REED, 1996). Após obtenção de material por quaisquer das técnicas acima, realiza-se esfregaço ou impressão por aposição em lâminas que deverão ser secadas à temperatura ambiente fixadas e coradas com Giemsa ou Leishman, a fim de se realizar pesquisa de amastigotas (MARZOCHI et al, 1999; Ministério da Saúde/Brasil, 2000). A vantagem da pesquisa direta do parasita é a sua

simplicidade, porém seus resultados variam amplamente com o tipo e duração da lesão (raramente positiva quando mais de um ano de evolução), assim como da presença ou não de contaminação bacteriana e da experiência do examinador (MARZOCHI et al, 1999; Ministério da Saúde/Brasil, 2000; PEARSON et al., 2000). O tamanho da lesão não parece estar associado a maior ou menor positividade (NAVIN, et al., 1990). O sítio da lesão de onde o material é obtido tem sido mencionado como determinante da a sensibilidade do exame direto, o que parece estar relacionado à maior ou menor carga de parasitas. Embora usualmente a borda endurecida seja recomendada para a obtenção de material para exame parasitológico (MARZOCHI et al., 1999; SALMAN et al., 1999, Ministério da Saúde/Brasil, 2000; PEARSON et al., 2000), estudo colombiano com 115 pacientes reportou maior sensibilidade de exame direto quando o material foi obtido do centro da lesão, e não da borda, com 90,4% e 78,3% de positividade respectivamente (RAMIREZ et al., 2000). Nenhuma diferença no diagnóstico parasitológico por exame direto de esfregaço ou cultura comparando o sítio da biópsia, centro, borda ou incisão tangenciando ambos, foi encontrada em uma série de 252 pacientes com diagnóstico confirmado de LC na Guatemala (NAVIN et al., 1990). Neste mesmo estudo (NAVIN et al., 1990), o número de esfregaços realizados para cada amostra de lesão obtida foi relevante em otimizar o diagnóstico, que foi confirmado em 70% dos casos onde um esfregaço foi realizado, 84% com dois, 92% com três, 94% com quatro e 100% com cinco esfregaços.

Considerando-se todas as variáveis discutidas, positividade de exame direto por aposição e esfregaço, respectivamente, tem sido reportada com uma diversidade de resultados em literatura:, 18,7% e 22,3% (WEIGLE et al., 1987), 29% e 100%

(NAVIN, et al., 1990), 78,8% e 98,5% (DEPS, 1998), 64,3% a 90,4% (RAMIREZ et al, 2000).

2.5.2.1.3 Cultivo “in vitro”

Cultura é um método de confirmação etiológica, permitindo inclusive a identificação da espécie da *Leishmania* isolada (Ministério da Saúde/Brasil, 2000).

O meio mais freqüentemente utilizado é o bifásico NNN, enriquecido com meio de Schneider. O crescimento ocorre em torno de uma a duas semanas, e formas promastigotas poderão ser visualizadas ao microscópio óptico (GREVELINK & LERNER, 1996; MAZORCHI, et al., 1999; SALMAN et al., 1999; Ministério da Saúde/Brasil, 2000). Entretanto, as culturas só podem ser descartadas como negativas após 4 semanas da data da inoculação (SALMAN et al., 1999; Ministério da Saúde/Brasil, 2000).

A positividade de técnicas de cultivo é bastante variável. De maneira geral, positividade de material cultivado “in vitro” tem sido reportada em literatura com valores distintos, desde 20% (BERMAN, 1997), 35,8% (PASSOS et al., 1999), 38% (NAVIN et al.,1990), 49,4% (WEIGLE et al., 1987), até 65% (DEPS, 1998). Esta variação depende de diversos fatores, entre eles a experiência do observador, a forma da doença e tempo de evolução, uso prévio de tratamento específico, assim como dos reagentes e qualidade dos meios de cultura empregados (ROMERO et al., 1999), estes bastantes complexos e dificilmente comparáveis (NAVIN et al., 1990). Estudo realizado com 68 pacientes na Bahia, utilizando meio modificado de “Marzochi” e inoculação de três aspirados de lesão cutânea, apresentou positividade de 47,1% (ROMERO et al., 1999).

A sensibilidade da cultura pode ser prejudicada pelo fato de que frequentemente poucos parasitas estão presentes nas lesões (RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2001). Habilidade para cultivar *Leishmania* foi correlacionada com a concentração de amastigotas vistas no exame direto do esfregaço em estudo na Guatemala, com 27% de positividade quando nenhuma amastigota foi vista em 400 campos de imersão em óleo e 83% quando no mínimo uma amastigota foi visualizada (NAVIN et al., 1990).

As diversas espécies, assim como variações de cepas, têm diferentes comportamentos em culturas, também alterando seus resultados. *L. (L.) mexicana* cresce em grande concentração em meio de cultura e é facilmente mantida em passagens seriadas, enquanto a *L. (V.) braziliensis* alcança uma fase estacionária com baixas concentrações, sendo algumas vezes difícil sua manutenção em cultura. Dessa forma, uma vez que a *L. (V.) braziliensis* parece ser mais arduamente isolada que *L. (L.) mexicana*, mais que 50% dos pacientes com cultura negativa podem estar na verdade infectados com *L. (V.) braziliensis*, levando a resultados falso-negativos (NAVIN et al, 1990).

2.5.2.1.4 Inoculação em Animais

Outro método de isolamento de *Leishmania* e confirmação diagnóstica é a inoculação de aspirado ou fragmento de biópsia em animais de laboratório, tendo como primeira escolha o “hamster”. Após obtenção, o material biopsiado deverá ser preparado através de maceração e diluição em solução salina estéril. Injeta-se geralmente o material homogeneizado nas extremidades do animal, patas ou cauda, preferencialmente nas patas posteriores (MARZOCHI et al., 1999; Ministério da Saúde/ Brasil, 2000).

O resultado só poderá ser avaliado após um período de um mês (Ministério da Saúde/ Brasil, 2000), quando as lesões começam a surgir no animal inoculado, com características clássicas relacionadas às diversas espécies. O animal apresenta nódulo discreto na área de inoculação com tendência a visceralização no caso de *L. (V.) braziliensis*, e nódulo grande com tendência a metastatização para extremidades no caso de *L. (L.) amazonensis* (MARZOCHI et al., 1999). A Positividade varia de 38,3% a 52,4% (WEIGLE et al., 1987), mas o tempo de crescimento do agente é lento, o que dificulta a utilização deste método e praticamente o inviabiliza como método diagnóstico isolado na prática clínica, sendo geralmente reservado para pesquisa (FALQUETO & SESSA, 1991; SALMAN et al., 1999; Ministério da Saúde /Brasil, 2000).

2.5.2.2 Histopatologia

As alterações histopatológicas da leishmaniose cutânea mostram alguns paralelos com outros granulomas infecciosos da pele (MEHREGAN et al., 1999), e não são patognomônicas, exceto quando identificamos formas amastigotas intracitoplasmáticas. Os achados histológicos são inespecíficos, e estão correlacionados com a apresentação clínica (MEHREGAN et al., 1999), sendo que nas lesões agudas o principal sítio da reação é a derme (MARZOCHI et al., 1999). Nesta região ocorre basicamente um infiltrado inflamatório mononuclear misto, intenso e difuso, composto predominantemente de macrófagos com uma mistura de linfócitos e células gigantes multinucleadas, que se estende além da área de ulceração. Também são observadas áreas de necrose na epiderme, na derme e na parede vascular, com vasculite, que parecem resultar de uma reação do tipo antígeno-anticorpo com excesso de antígenos (RASO & GENARO, 2000). Podem ser

visualizadas células plasmáticas contendo corpúsculos eosinofílicos de “Russel”, que indicam produção de imunoglobulina, e, raramente, pequena quantidade de neutrófilos e eosinófilos (MEHREGAN et al., 1999). Ainda nas lesões recentes, reação granulomatosa desorganizada com macrófagos e células de Langhans é descrita. Com a evolução, podem surgir granulomas típicos do tipo tuberculóide, e corpúsculos de Leishman, amastigotas dentro de macrófagos, podem ser vistos em até 60% dos casos, principalmente nas papilas dérmicas e próximo às áreas de necrose (MEHREGAN et al., 1999; RASO & GENARO, 2000). Mais tardiamente, ocorre regressão do infiltrado celular, surgindo fibrose, com redução do número de parasitas. Os anexos cutâneos sofrem hipotrofia ou atrofia, com alterações epidérmicas constituídas de acantose e papilomatose, conhecida como hiperplasia pseudo-epiteliomatosa (WEIGLE & SARAVIA, 1996; MEHREGAN et al., 1999; RASO & GENARO, 2000).

MAGALHÃES et al. (1986) sugeriram cinco padrões histopatológicos evolutivos para a LT: reação exsudativa celular, com infiltrado histioplasmocitário; reação exsudativa e necrótica, com necrose no centro do infiltrado inflamatório; reação exsudativa e necrótico-granulomatosa, com inflamação granulomatosa crônica e necrose; reação exsudativa e granulomatosa, com granulomas desorganizados e sem necrose; e reação exsudativa tuberculóide, caracterizada pelo granuloma tuberculóide. O padrão de reação exsudativa celular estaria presente no início e final da evolução da lesão, e os demais interpostos durante a evolução da LT. Também RIDLEY et al. (1989) propuseram uma análise histológica evolutiva de forma estratificada, associando curso da doença, processo histopatológico e “eliminação” de parasitas. Entretanto, estas classificações similares àquelas

desenvolvidas para hanseníase, variando evolutivamente de um extremo “lepromatoso” com numerosas amastigotas, ao extremo “tuberculóide” caracterizado por granulomas organizados e escassez de amastigotas, não foram reproduzidas em estudos mais recentes. As lesões freqüentemente contêm alterações histopatológicas concomitantes, com elementos de necrose granulomatosa e macrófagos, alguns dos quais organizados em granulomas, sem correlação com fases de evolução da doença (BITTENCOURT & BARRAL, 1991; WEIGLE & SARAVIA, 1996).

A freqüência da positividade de achado de parasitas em biópsias coradas convencionalmente pelo H&E é reportada com valores diferentes, sendo referida numa variação de 14,1% (WEIGLE et al., 1987), 18% (NAVIN et al., 1999), 20% (SOTTO, et al., 1989), 40% (GUTIERREZ, et al., 1991), 42% (KENNER et al., 1999), 60% (RASO & GENARO, 2000), até 63,7% (MAGALHÃES et al., 1986). Assim como ocorre com o exame direto, o achado de amastigotas à histopatologia irá variar com o tempo de evolução da lesão, forma da doença, experiência do examinador (RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2001), e ainda com o número de amastigotas presentes na lesão (NAVIN et al., 1999). Não obstante, exame histopatológico como único meio diagnóstico pode levar a erro diagnóstico em 42% de casos confirmados (NAVIN et al., 1999). Na tentativa de tornar possível o diagnóstico etiológico da LT, mesmo quando há escassez do agente nos tecidos, diversas técnicas têm sido aplicadas em laboratórios de patologia.

A utilização de técnicas de imunoperoxidase indireta com emprego de anticorpos policlonais anti-*Leishmania*, pode ser realizada em laboratórios de patologia, com interpretação simples, chegando a aumentar em até duas vezes a identificação de amastigotas em histopatologia (RASO & GENARO, 2000).

Sistemas amplificados de imunohistoquímica com peroxidase antiperoxidase (PAE) podem aumentar em 40% a positividade de diagnóstico em material de biópsia (SOTTO et al., 1989, RASO & GENARO, 2000), e o emprego de imunofluorescência indireta pode alcançar uma positividade de 75,7% (SILVEIRA, T.G.V. et al., 1999) a 80% (SOTTO et al., 1989). KENNER et al. (1999), estudando 61 pacientes com LC, reportaram uma positividade de 82% ao associar H & E e imuno-histoquímica usando um anticorpo monoclonal anti-*Leishmania* (G2D10).

Em resumo, a histopatologia tem sua sensibilidade limitada provavelmente por escassez e distorção de amastigotas durante a fixação do material (WEIGLE et al., 1987), e algumas vezes pela dificuldade de distingui-las de debris nucleares entre o denso infiltrado inflamatório (SOTTO et al., 1989; KENNER et al., 1999). Entretanto, uma vez que este método tem a vantagem de permitir diagnóstico diferencial através de identificação de outros possíveis agentes etiológicos, e outras doenças inflamatórias ou tumorais, deve ser considerado de grande relevância a sua realização de rotina no diagnóstico da LC (WEIGLE et al., 1987; SOTTO et al., 1989; MEHREGAN et al., 1999; NAVIN et al., 1999; RASO & GENARO, 2000).

2.5.2.3 Métodos Imunológicos

2.5.2.3.1 Intradermorreação de Montenegro (IDRM)

O teste intradérmico de Montenegro é uma reação do tipo hipersensibilidade tardia, refletindo resposta imune mediada por células, semelhante ao teste de tuberculina (FESTA NETO et al., 1991; SALMAN et al., 1999). É realizado com antígeno de promastigotas mortas, utilizando geralmente *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, com exceção de alguns centros que empregam frações protéicas ou extratos solúveis do antígeno (FESTA NETO et al., 1991; BERMAN, 1997).

Diferentes espécies de *Leishmania* apresentam diferentes capacidades de induzir proliferação linfocitária, sendo que IDRM realizada com antígenos de *L. (V.) braziliensis* tem se mostrado mais eficiente em desencadear resposta antigênica do que aquela realizada com antígenos de *L. amazonensis* (SILVEIRA F.T. et al., 1999).

O antígeno padronizado é injetado, 0,1ml (40 µg/ml), por via intradérmica na face anterior de antebraço, aproximadamente 2 a 3cm abaixo da prega cubital, procedendo-se leitura após 48 a 72 horas. É considerado positivo quando ocorre formação de halo de endurecimento com diâmetro maior ou igual a 5 mm (Ministério da Saúde/Brasil, 2000; DA-CRUZ & AZEREDO COUTINHO, 2001).

Este teste tem sido classicamente utilizado para detecção de exposição à *Leishmania*, auxiliando no diagnóstico de LC. Entretanto, não discrimina se a infecção é recente ou antiga (GREVELINK & LERNER, 1996; REED, 1996; DA-CRUZ & AZEREDO COUTINHO, 2001), podendo, em alguns casos, sugerir presença de infecção subclínica em pacientes sem qualquer história clínica sugestiva da doença no passado (FESTA NETO et al., 1991; GREVELINK & LERNER, 1996).

A positividade da IDRM em pacientes com LC fica em torno de 90% a 98% (GREVELINK & LERNER, 1996), sendo reportada em literatura numa variação de 70% (WEIGLE et al, 1987), 92,2% (SESSA et al, 1991), 95,1% (SILVEIRA, T.G.V. et al.,1999), 96% (MACHADO et al., 2002), 96,6% (DEPS, 1998), a 100% (KAR, 1995).

Resultados falso-negativos podem estar relacionados à LC com lesões disseminadas, tempo de início das lesões menor do que 30 dias mesmo em LCL,

pacientes com LCD, e pacientes imunodeprimidos (SALMAN et al., 1999; Ministério da Saúde/Brasil, 2000; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2001).

A duração da positividade à IDRM após cura das lesões é indeterminada, e pode permanecer positiva por tempo indefinido em alguns casos (FESTA NETO et al., 1991; KAR, 1995; MARZOCHI et al., 1999), apresentar redução na sua intensidade com o tempo em outros (MAYRINK et al., 1976), e até mesmo se negativar em indivíduos fraco reatores e naqueles precocemente tratados (Ministério da Saúde/Brasil, 2000). Reporta-se aumento na resposta e até mesmo transformação de testes negativos em positivos, existindo a possibilidade de que represente reação a novos contatos com o agente etiológico de forma assintomática, reforço natural, assim como reação a repetidas exposições ao antígeno da própria IDRM (MARZOCHI et al., 1999).

Este teste cutâneo é preparado mais comumente com promastigotas íntegras suspensas em solução salina fenolada. Entretanto, preparados solúveis padronizados demonstraram maior efetividade na indução de resposta de hipersensibilidade retardada do que preparados de células íntegras (REED et al., 1996), indicando que um teste constituído de proteínas recombinantes poderia ser desenvolvido. Assim, um teste intradérmico utilizando antígenos sintéticos específicos, requerendo pouca tecnologia e de fácil interpretação, poderia ser utilizado para distinguir as infecções causadas por diferentes espécies de *Leishmania*, tendo como grandes vantagens sua simplicidade e praticidade (REED, 1996). Entretanto, além de existirem dificuldades na padronização da produção de antígenos, deve-se recordar que a técnica falha em distinguir entre infecções antigas e recentes (GREVELINK & LERNER, 1996; REED, 1996; DA-CRUZ & AZEREDO COUTINHO, 2001; RAMOS-E-SILVA &

JACQUES, 2001), sendo sempre necessária criteriosa avaliação clínica. Por continuar positiva mesmo após tratamento, a IDRM não pode ser utilizada para seguimento evolutivo de LC. Não obstante, a reação de Montenegro continua sendo importante no diagnóstico de lesões mais antigas aonde a presença do parasita é mais rara (RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2001).

2.5.2.2.2 Reações Sorológicas

A sensibilidade e especificidade das técnicas sorológicas de diagnóstico dependem do tipo, fonte e pureza do antígeno empregado, reprodutibilidade e complexidade das técnicas, além do fato de que os antígenos da *Leishmania* têm epítomos que podem apresentar reação cruzada com outros microorganismos, como *Trypanosoma*, *Mycobacteria*, *Plasmodium* e *Schistosoma* (KAR, 1995).

Anticorpos (Ac) de classe Imunoglobulina (Ig) M podem ser observados em pacientes com lesões cutâneas nos primeiros quatro meses de evolução, e Ac IgG podem ser encontrados em altos títulos em pacientes com lesões cutâneas extensas e múltiplas (MARZOCHI et al., 1999; Ministério da saúde/Brasil, 2000).

A destruição parasitária com liberação de antígenos causada pelo tratamento poderia ser responsável pelo aumento de anticorpos circulantes durante e após terapêutica apropriada, porém, em lesões cutâneas, este fato não parece ser de grande relevância em traduzir-se em maior positividade de testes sorológicos (MARZOCHI et al., 1999), exceto em casos de lesões extensas e múltiplas (Ministério da saúde/Brasil, 2000). Estes podem ser positivos em baixos títulos ou até mesmo negativos em todas as fases da doença, podendo diminuir ou desaparecer após tratamento (DA-CRUZ & AZEREDO COUTINHO, 2001).

O fato de pacientes de áreas endêmicas sem lesões aparentes, assim como pacientes com outras doenças como Chagas, Malária, e Hanseníase, poderem apresentar testes sorológicos positivos, e, por outro lado pacientes imunodeprimidos apresentarem testes sorológicos negativos, limita o uso desta metodologia no diagnóstico de LC (BERMAN, 1997; MARZOCHI et al., 1999; PIÑERO et al., 1999).

A pesquisa de anticorpos anti-Leishmania em LC pode ser feita por aglutinação direta (DAT), ensaio imunoenzimático (ELISA), e imunofluorescência indireta (IFA) (GREVELINK & LERNER, 1996; MARZOCHI et al., 1999. DA-CRUZ & AZEREDO COUTINHO, 2001).

A IFA e DAT utilizam antígeno de promastigotas inteiras, o que limita a especificidade dos testes, e traz problemas para a sua padronização (REED, 1996). A reatividade cruzada da IFA pode ser quase que eliminada com a utilização de amastigotas como substrato antigênico, indicando que antígenos de superfície deste estágio do ciclo de vida do parasita são mais específicos do que aqueles do promastigota (KAR, 1995). Estes testes são pouco sensíveis em casos de LCL, devido ao baixo nível de anticorpos circulantes e ao fraco potencial antigênico do parasita envolvido, sendo mais sensíveis em LCM. A IFA, além de não ser automatizada, necessitar de microscópios fluorescentes e consumir muito tempo, depende da interpretação subjetiva, o que pode complicar a distinção de soros com baixos títulos. Já o DAT, é mais adaptável às condições de campo, porém tem um fator limitante que é a necessidade de refrigeração.

Testes de ELISA geralmente utilizam parasitas lisados, são muito mais quantitativos, versáteis e adaptáveis. Porém, assim como naqueles testes que utilizam

parasitas inteiros, nunca se espera especificidade maior do que aqueles que empregam antígenos específicos. Atualmente, antígenos recombinantes de *Leishmania* têm sido adaptados para testes diagnósticos com mais alta sensibilidade e especificidade, em técnicas de ELISA ou imunocromatografia (KAR, 1995; REED, 1996).

Com a melhora dos reagentes, a pesquisa sorológica tem se tornado mais rapidamente difundida inclusive sob condições de campo. No entanto, não podemos nunca esperar especificidade máxima tanto dos testes que utilizam parasitas íntegros como lisados, uma vez que os antígenos definidos podem ser ambos gênero e espécie específicos. Entre os três testes, o ELISA pode ser rapidamente adaptado para o uso de antígenos definidos, oferecendo potencial redução de custo, fácil padronização, produção em larga escala, e melhora da sensibilidade e especificidade (KAR, 1995; REED, 1996). Entretanto, mesmo com melhora das técnicas sorológicas, sua sensibilidade encontra-se numa razão de 67% a 76%, não sendo utilizadas rotineiramente para o diagnóstico na leishmaniose tegumentar (BERMAN, 1997).

Devido à baixa sensibilidade e especificidade destes métodos nos casos de LC, os mesmos raramente são utilizados para diagnóstico (BERMAN, 1997). O papel dos testes sorológicos é limitado, podendo ser empregados no seguimento e na evolução da doença durante e após o tratamento (RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2001). Não obstante, existem controvérsias também quanto a este uso devido à diversidade de resposta humoral ligada a características individuais do hospedeiro e da forma de doença cutânea apresentada (MARZOCHI et al., 1999), assim como persistência de positividade após a cura e em indivíduos aparentemente saudáveis (DAVIES et al., 2003).

2.5.2.4 Métodos de Identificação Da Espécie

Embora cada espécie de *Leishmania* possa ter manifestações mais peculiares e áreas de maior endemicidade (WEIGLE & SARAIVA, 1996), nenhuma das manifestações é única e particularmente relacionada a uma ou outra destas espécies, havendo consideráveis diversidades e sobreposições clínicas dependentes de determinantes relativas à infectividade de cada espécie e a fatores do hospedeiro (GRIMALDI et al., 1989; SALMAN et al., 1999; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2001).

Sabe-se que existe o risco de pacientes com LCL infectados com *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis* desenvolverem posteriormente doença cutâneo-mucosa (GREVELINK & LERNER, 1996; MARZOCHI et al., 1999), além da possibilidade de espécies tradicionalmente associadas com LC desencadearem LV e vice-versa, como *L. (L.) chagasi* isolada de pacientes com LC e *L. (L.) amazonensis* de pacientes com LV (GRIMALDI et al., 1989; REED, 1996).

A identificação da espécie do parasita é importante para o diagnóstico da doença, estando relacionada a diferenças na infectividade e patogenicidade do mesmo, aspectos estes ligados principalmente à estrutura molecular da gp63 e LPG, assim como às estratégias de evasão utilizadas por cada espécie em particular (BOGDAN et al., 1990; GRIMALDI & TESH, 1993; WEIGLE & SARAIVA, 1996; RITTIG & BOGDAN, 2000). Desta forma, o diagnóstico mais específico do agente etiológico envolvido denota extrema relevância, podendo interferir na avaliação terapêutica (GRIMALDI & TESH, 1993; KOFF, A. B. & ROSEN, 1994; SILVEIRA F.T. et al, 1998; ESCOBAR et al., 2002) e prognóstica, assim como nos métodos de controle da doença (GRIMALDI et al., 1987; GRIMALDI et al., 1989;

GREVELINK & LERNER, 1996; SCHÖNIAN et al., 1996; BELLÍ et al., 1998; MEHREGAN et al., 1999; SALMAN et al., 1999).

Vários métodos bioquímicos, sorológicos e moleculares têm sido propostos para identificar e diferenciar as várias espécies e “subespécies” de *Leishmania*, uma vez que existem implicações clínicas, evolutivas e prognósticas relacionadas às diferentes espécies. Entre as diversas técnicas desenvolvidas, encontramos a utilização de anticorpos monoclonais espécie-específicos para antígeno de superfície, análise com isoenzimas, análise molecular com técnicas de PCR, hibridização, e análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição do DNA.

A PCR parece ser a técnica mais factível, e em termos de sensibilidade e especificidade pode chegar a 100% com o uso de “primers” apropriados (REED, 1996; ANDRADE, A.S.R. et al, 2001; MARQUES et al., 2001; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2001).

2.5.2.4.1 Análise de Zimodemas ou Isoenzimas

Apenas a morfologia do crescimento de promastigotas de *Leishmania* em cultura não permite a discriminação da espécie envolvida (SALMAN et al., 1999). A identificação de espécies pode ser auxiliada pela eletroforese de isoenzimas, ou enzimas com mesma função biológica, de material obtido de cultura. Este método, baseado em critérios bioquímicos e fenotípicos (BRAHIM, 1999; SALMAN et al., 1999), confronta diferentes perfis eletroforéticos de enzimas que representam um marcador molecular específico para as diferentes espécies de *Leishmania* (GRIMALDI et al., 1987). Assim, na comparação entre dois ou mais agentes, as bandas representando uma determinada enzima mas com diferentes mobilidades indica que os mesmos são geneticamente distintos. Quanto maior for o número de

enzimas com perfil diferente, maior será a diferença entre os agentes etiológicos, sendo o grau de identidade diretamente proporcional ao número de isoenzimas homogêneas (BRAHIM, 1999). A eletroforese de enzimas pode não ser capaz de distinguir uma espécie de outra, mas pode identificar a maior ou menor homogeneidade entre uma mesma espécie.

Não obstante, este é um processo lento e caro, que requer cultura de parasitas em larga escala para obter quantidade suficiente, com baixo percentual de sucesso na identificação do parasita. Tem sua aplicação mais ligada a estudos epidemiológicos do que diagnósticos (PASSOS et al., 1999).

2.5.2.4.2 Anticorpos Monoclonais

Anticorpos monoclonais têm sido utilizados para diagnóstico de LC, com sensibilidade em torno de 90% (BERMAN, 1997). Um anticorpo monoclonal que reconheça um epítipo conservado em todas as espécies de *Leishmania*, como parece ser o caso do Ac G2D10, pode ter grande utilidade no “screening” geral de tecidos para leishmaniose, associado a dados de clínica e histopatologia (KENNER, et al., 1999). São também empregados na identificação das diferentes espécies de *Leishmania*, através do reconhecimento de seus epítipos específicos. A alta especificidade de alguns anticorpos monoclonais permite então a identificação do parasita em um nível de espécie e subespécie (GRIMALDI et al., 1987; BRYCESON, 1996, SALMAN et al., 1999).

Eletroforese de enzimas tem sido utilizada como método padrão no reconhecimento de variação antigênica das mesmas espécies, porém seus resultados isolados não são conclusivos na identificação de espécies, o que pode ser conseguido com a aplicação de Ac monoclonais espécie-específicos (ROMERO et al., 2002).

GRIMALDI et al. (1989) estudaram mais de 1000 isolados de *Leishmania* de homens, animais, e flebotomíneos de várias regiões das Américas, que foram caracterizadas por Ac monoclonais espécie-específicos, mostrando que neste continente a *L. (V.) braziliensis* é a espécie mais amplamente distribuída. Estudo empregando Ac monoclonais realizado com 1418 pacientes com LTA no Estado do Paraná identificou 98,7% das cepas isoladas como *L. (V.) braziliensis* (63,6% serodema 1 e 3, e 31,2% serodema 3) e 1,3% como *L. (L.) amazonensis*, (SILVEIRA T.G.V. et al., 1999). Em Manaus, 80 isolados de 68 pacientes com LC foram identificados como *L. (V.) guyanensis* por análise de isoenzimas, porém, Ac monoclonal B19, específico para esta espécie, falhou nesta identificação, o que sugere a existência de variantes com diversidade de epítomos ou outros fatores que possam causar este tipo de inexatidão (ROMERO et al., 2002).

Uma reconhecida limitação deste método reside no fato de que a arquitetura interna da *Leishmania* não fica muito distinta, levando a uma dificuldade em diferenciá-la de debris de tecido do hospedeiro, necessitando então de observador bastante treinado (BERMAN, 1997). Seu uso é ainda bastante restrito a laboratórios de pesquisa (SALMAN et al. 1999).

2.5.2.4.3 Diagnóstico Molecular

Técnicas baseadas em análise de DNA estão sendo cada vez mais utilizadas no diagnóstico e caracterização de espécies de *Leishmania* (SALMAN et al., 1999). O material a ser analisado pode ser adquirido através de aspirado, raspado ou biópsia de lesão cutânea, aplicando-se técnicas de hibridização, PCR, análise de kDNA por enzimas de restrição (GREVELINK & LERNER, 1996; MARZOCHI et al., 1999). Uma das vantagens das técnicas de diagnóstico molecular é a possibilidade de

aplicação mesmo quando dispomos de pequena amostra de material (GREVELINK & LERNER, 1996).

PCR tem se mostrado um método sensível na detecção e especificação de *Leishmania* indiferentemente à escassez de parasitas na lesão biopsiada, principalmente em lesões antigas (MEHREGAN et al., 1999; SALMAN et al., 1999). Dependendo do tipo de “primer” utilizado, esta abordagem molecular pode permitir a amplificação de DNA específico para gênero (SCHUBACH et al., 1998), específico para subgênero (DE BRUJIN & BARKER, 1992), ou específico para determinada espécie de *Leishmania* (BELLI et al., 1998). É uma técnica sensível, rápida, e que pode caracterizar a espécie do agente etiológico simultaneamente à realização da confirmação diagnóstica (SCHÖNIAN et al., 1996; BELLI et al., 1998). Apresenta ainda vantagens como o fato de poder utilizar tanto amostras estocadas (DEGRAVE et al., 1994) quanto amostras que não passaram por preparo (DE BRUJIN et al., 1993) sem prejuízo em seus resultados, assim como ser capaz de analisar várias amostras concomitantemente, fatos estes que facilitam sua aplicação em áreas endêmicas e condições de campo (WILSON, 1995).

2.6 TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Diagnóstico e intervenção terapêutica precoces estão associados à alta taxa de cura e sucesso em muitas doenças infecciosas. Sendo assim, para alguns autores (KOFF & ROSEN, 1994; BRYCESON, 1996; MARZOCHI et al., 1999; DA CRUZ & AZEREDO COUTINHO, 2001), mesmo pacientes com lesões cutâneas únicas e localizadas deverão receber tratamento específico, a despeito da possibilidade de cura espontânea e sem complicações, visto que esta estratégia pode acelerar a

cicatrização e reduzir a severidade dos danos causados por este processo. Entretanto, existem controvérsias, e determinados autores (GREVELINK & LERNER, 1996; HERWALDT, 1999) indicam terapia essencialmente se as lesões ocorrem na face ou outras áreas do corpo que possam ser estigmatizantes. Não obstante, há consenso de que em regiões geográficas onde há prevalência de leishmaniose cutâneo-mucosa, ou quando as lesões são sabidamente causadas por *L. (V.) braziliensis*, tratamento sistêmico é requerido a fim de prevenir futuras lesões mucosas (BRYCESON, 1996; GREVELINK & LERNER, 1996; HERWALDT, 1999; PEARSON et al., 2000).

Assim, embora pouco se tenha provado a respeito da eficácia do tratamento, três considerações devem ser sempre feitas: a possibilidade de cura espontânea de lesões cutâneas em um tempo médio de um ano, a imunidade do hospedeiro acometido e a espécie de *Leishmania* envolvida (MOSKOWITZ & KURBAN, 1997). A aplicação de técnicas de biologia molecular tem possibilitado a caracterização da espécie causadora de LC com maior agilidade, o que pode auxiliar nas decisões relativas à abordagem terapêutica a ser empreendida (KOFF & ROSEN, 1994; MOSKOWITZ & KURBAN, 1999; SALMAN et al., 1999). Sabe-se, por exemplo, que *L. (L.) mexicana* é menos sensível a antimoniais do que *L. (V.) braziliensis* (KOFF & ROSEN, 1994), que ketoconazol é efetivo contra *L. (L.) mexicana*, mas não contra *L. (V.) braziliensis* (MIMORI et al., 1998), e que tratamento tópico não deve ser utilizado em LC causada por *L. braziliensis* pelo risco de metastatização (MOSKOWITZ & KURBAN, 1999), o que poderia justificar uma estratégia diferenciada na escolha do tratamento espécie-específico mais apropriado.

Na grande maioria das vezes os pacientes com LC podem ser tratados ambulatorialmente, não necessitando internações, exceto nos seguintes casos: lesões

muito extensas e com alterações funcionais, evolução aberrante ou resposta terapêutica ruim, paciente com maior risco de efeitos colaterais às drogas utilizadas. Pacientes com infecções por outros agentes concomitantes deverão receber tratamento primeiro para estas outras afecções, e posteriormente para LC (BERMAN, 1996; MARZOCHI et al., 1999).

MACHADO et al. (2002) estudando prospectivamente 22 pacientes com LC nos quais diagnóstico e tratamento (antimonial) precoces foram instituídos, encontraram 46% de falha terapêutica traduzida por aumento da lesão ulcerada, assim como achados histológicos compatíveis com resposta inflamatória exacerbada. Analogamente, alterações histopatológicas compatíveis com processo inflamatório em atividade (BOTELHO et al., 1998), exame direto positivo (BOTELHO et al., 1998), e isolamento de *Leishmania* em cultura (BOTELHO et al., 1998) de cicatrizes de lesões cutâneas consideradas curadas têm sido reportados, ocasionando dúvidas quanto aos critérios de cura corriqueiramente adotados, assim como a verdadeira possibilidade de cura.

Infelizmente, devido à probabilidade de regressão espontânea de lesões de LC ocorrer acima de 90% dos casos (DAVIES et al., 2003), assim como à grande disparidade entre os critérios usados para mensurar respostas aos diferentes tratamentos empregados (KOFF & ROSEN, 1994), grandes dificuldades têm sido encontradas no estabelecimento de ensaios terapêuticos, e nenhum tratamento ideal tem sido identificado (HERWALDT, 1999).

2.6.1 ANTIMONIAIS PENTAVALENTES

As drogas de primeira escolha no tratamento da LC continuam sendo os antimoniais pentavalentes, representados pelo Antimoniato de meglumina

(Glucantime®) e o Estibogluconato de sódio, cada um comercializado em ampolas contendo 425mg (85 mg/ml) e 500mg (100 mg/ml) do Antimônio respectivamente (MARSDEN, 1985; KOFF & ROSEN, 1994; AMATO et al., 1996; BERMAN, 1996; HERWALDT, 1999; MOSKOWITZ & KURBAN, 1999; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2001; OMS/WHO, 2002; Ministério da Saúde/Brasil, 2002; DAVIES et al., 2003). O uso do Estibogluconato de Sódio de procedência chinesa foi suspenso pelo Ministério da Saúde brasileiro desde 1997 devido à sua toxicidade hepática e pancreática (DEPS, 1998).

O Ministério da Saúde brasileiro recomenda doses de 10-20 mg/kg/dia, em média 15 mg/Kg/dia, durante 20 dias seguidos. Os pacientes são acompanhados nos 3 meses seguintes, e, caso não tenha ocorrido cicatrização das lesões, com reepitelização e regressão completas da inflamação e eritema (critério clínico de cura), novo ciclo de drogas pode ser reiniciado, agora com duração de 30 dias. Quando não ocorre resposta a esta segunda tentativa, uma droga de segunda escolha deverá ser utilizada (Ministério da Saúde/Brasil, 2002).

Existem também outras propostas de tratamento com objetivo principal de melhorar resposta e reduzir efeitos adversos, como utilização de séries intercaladas com e sem droga até cicatrização das lesões (AZEREDO-COUTINHO & MENDONÇA, 2002), uso de doses mais baixas por tempo mais prolongado (OLIVEIRA-NETO et al., 1997), ou aplicações intralesionais (GADELHA et al., 1990).

Independente do plano terapêutico adotado, avaliações clínicas, laboratoriais, assim como eletrocardiográficas deverão ser realizadas anteriormente, e, se possível, semanalmente, a fim de detectar maior risco e alterações precocemente. Sempre que

ocorrerem alterações progressivas ou persistentes, o tratamento deverá ser interrompido temporariamente, com indicação de internação hospitalar para que uma monitorização mais efetiva seja realizada. Os principais efeitos colaterais estão relacionados à deterioração da função hepática e renal (RODRIGUES, M.L.O. et al., 1999), alterações de repolarização ventricular e arritmias ao eletrocardiograma (MARSDEN, 1985; RIBEIRO, et al., 1999). Podem ainda surgir artralgia, mialgia, fraqueza, edema, febre, calafrios, prurido, erosões cutâneas, distúrbios gastrintestinais, pancreatite, cefaléia, tonteira, neuropatia periférica, insônia, nervosismo, dispnéia, além de relatos de anemia hemolítica e herpes zoster (MOSKOWITZ & KURBAN, 1999). Os pacientes considerados de maior risco são os cardiopatas, nefropatas, hepatopatas, e idosos (MARSDEN, 1985; MARZOCHI et al., 1999).

2.6.2 ANFOTERICINA B

Anfotericina B é a droga de segunda escolha para o tratamento de LTA, na dose de 1mg/kg/dia, com dose máxima diária de 50mg (AMATO et al., 1996; Ministério da Saúde/Brasil, 2002). Também aqui as reações adversas podem ser importantes, devendo-se fazer eletrocardiograma, exame clínico e laboratorial criteriosos inicialmente e semanalmente, incluindo dosagem de sódio e potássio. As principais reações adversas são: febre, calafrios, cefaléia, anorexia, distúrbios gastrintestinais, gosto metálico na boca, flebites, hipomagnesemia, hipopotassemia, acidose tubular renal, insuficiência renal, hipertensão e arritmias cardíacas. Mais raramente pode ocorrer anafilaxia, leucopenia e trombocitopenia. Geralmente estas alterações regredem após um tempo variável da suspensão da droga. Também aqui, os cardiopatas, nefropatas, hepatopatas e idosos, apresentam maior risco de

apresentar efeitos adversos (CASTRO, 1972; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2001). Estudos com a utilização de anfotericina lipossomal têm sido desenvolvidos, com menor índice de efeitos colaterais, porém ainda com custo muito elevado (AMATO et al, 1996; SAMPAIO & MARSDEN, 1997).

2.6.3 PENTAMIDINA

Outra droga alternativa no tratamento da LC é a Pentamidina, encontrada sob a forma de isotianato e mesilato de pentamidina, contendo 300 mg por frasco, e utilizada na dose de 4 mg/kg intramuscular de dois em dois, num total que varia de três a vinte doses de acordo com a forma e extensão da doença (AMATO et al., 1996; BERMAN, 1997; MOSKOWITZ & KURBAN, 1999; Ministério da Saúde/Brasil, 2002). Exame clínico, laboratorial e eletrocardiograma devem fazer parte da monitorização inicial e durante todo tratamento. Hipotensão e síncope podem ocorrer em casos de infusão rápida da droga. Outros eventos adversos são descritos, como: tonteira, lipotímia, cefaléia, distúrbios gastrintestinais, hipoglicemia, e hiperglicemia, levando em casos de utilização de altas doses a diabetes mellitus insulino-dependente. Pentamidina é contra-indicada em pacientes cardiopatas, hepatopatas, nefropatas, grávidas e crianças com peso inferior a 8 kg (MARSDEN, 1985; SAMPAIO et al., 1988; AMATO et al., 1996; MARZOCHI et al., 1999; MOSKOWITZ & KURBAN, 1999; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2001).

2.6.4 OUTRAS DROGAS

Diversas drogas têm sido reportadas como úteis no tratamento de LC, porém nenhuma delas apresentou resultados consistentes a fim de destituir os antimoniais da posição de primeira escolha terapêutica. Dentre elas a terapêutica oral com itraconazol (DOGRA & SAXENA, 1996; BERMAN, 1997; MOSKOWITZ &

KURBAN, 1999; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2001), ketoconazol (KOFF & ROSEN, 1994; BERMAN, 1997; HERWALDT, 1999; MOSKOWITZ & KURBAN, 1999; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2001; DAVIES et al., 2003), fluconazol (DAVIES et al., 2003), dapsona (MOSKOWITZ & KURBAN, 1999), alopurinol (KOFF & ROSEN, 1994; BERMAN, 1997; MOSKOWITZ & KURBAN, 1999; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2001), além de miltefosine (HERWALDT, 1999; SOTO et al., 2001; ESCOBAR et al., 2002), este ainda em investigação.

2.6.5 OUTRAS MODALIDADES DE TRATAMENTO

Terapia intralesional ou local seria bastante interessante, uma vez que evitaria o risco de efeitos colaterais importantes causados pelas drogas sistêmicas, além da facilidade de administração (MOSKOWITZ & KURBAN, 1999).

Dentre as opções correntes, encontram-se as modalidades físicas, como excisão cirúrgica de lesões localizadas, termoterapia, crioterapia, e eletroterapia (KOFF & ROSEN, 1994; HERWALDT, 1999; MOSKOWITZ & KURBAN, 1999; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2001).

Algumas drogas também têm sido utilizadas localmente, como associação de paromomicina e metilbenzetonium (SOTO et al., 1998), paromomicina isolada (BERMAN, 1997; HERWALDT, 1999; MOSKOWITZ & KURBAN, 1999; STANIMIROVIC, 1999), e antimonial pentavalente (GADELHA et al., 1990; AMATO et al., 1996; BERMAN, 1997; HERWALDT, 1999; MOSKOWITZ & KURBAN, 1999; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2001), com resultados sempre aquém do alcançado com a terapêutica convencional.

Imunoterapia tem sido investigada (KOFF & ROSEN, 1994; HERWALDT, 1999), representada principalmente pelo uso de Interferon em combinação com

antimonial, especialmente em casos refratários (AMATO et al., 1998; MOSKOWITZ & KURBAN, 1999). Uma vez que o uso sistêmico de interferon é responsável por importantes e freqüentes efeitos colaterais, seu uso intralesional tem sido proposto, principalmente em LCL (KOFF & ROSEN, 1994; BERMAN, 1996). Estudos anedóticos com uso de autoleucócitos intralesionais (DABIRI et al., 2000), e imunomoduladores tópicos como Imiquimod (HERWALDT, 1999; AREVALO et al., 2001) têm sido reportados, necessitando de futuras investigações.

Vacinas têm sido empregadas com finalidade terapêutica (MAYRINK et al., 1991; CONVIT, 1996), estando seu uso indicado apenas como adjuvante ou alternativamente em casos em que o tratamento convencional esteja contra-indicado.

Inicialmente pensou-se que o tratamento local seria de grande viabilidade, baseado no grande percentual de cura espontânea de lesões cutâneas. Entretanto, sabe-se que mesmo em lesões localizadas existe a probabilidade de existir metastatização e presença do agente etiológico em locais distantes, como no sistema linfático, o que seria responsável por falhas ou recaídas. Além disso, muitas formas carecem de ensaios e seguimentos apropriados, assim como de protocolos padronizados (MOSKOWITZ & KURBAN, 1999).

Uma vez que o próprio mecanismo imunopatogênico da leishmaniose não está completamente estabelecido, também o seu tratamento, assim como critérios de cura ainda estão por ser definidos.

2.7 PROFILAXIA

A diversidade da doença e de sua epidemiologia torna impossível o controle com apenas uma estratégia. Os principais focos de atenção para prevenção da

leishmaniose são: controle do vetor e de possíveis reservatórios, associado ao diagnóstico e tratamento precoces e eficazes dos hospedeiros humanos, assim como notificação dos casos (MARZOCHI et al., 1999; ASHFORD, 2000; RAMOS-E-SILVA & JACKES, 2002; WHO, 2002).

Diversos estudos abordando identificação de flebotomíneos, assim como suas características e comportamento encontram-se publicados, porém ainda não se estabeleceu controle eficaz e de aplicação factível (BARROS et al., 1985; SESSA et al., 1985; FALQUETO et al., 1993; FALQUETO, 1995; RAMOS-E-SILVA & JACKES, 2002). Inseticidas residuais intra e peridomiciliares são tradicionalmente utilizados, e outros métodos estão sob avaliação, a fim de um controle mais sustentado e de uso em larga escala (KLAUS et al., 1999).

Quanto aos reservatórios animais, quando a LTA ocorre no domicílio e peridomicílio, os cães são os principais implicados (BARROS et al., 1985; SESSA et al., 1985; FALQUETO et al., 1986; FALQUETO et al., 1991; FALQUETO et al., 1993; SESSA et al., 1994; PASSOS et al., 1996; SALIBA & OUMEISH, 1999; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2002). Tanto por questões culturais, como porque tratamento da doença nestes animais não apresenta boa resposta, as formas de controle desta fonte de infecção permanecem controversas. Nos casos em que a transmissão é fundamentalmente silvestre, medidas direcionadas à redução de vetores e reservatórios animais são ainda mais complexas.

O hospedeiro humano tem se mostrado importante como fonte de infecção, uma vez que, além da possibilidade de apresentar formas inaparentes, mantém agentes infectantes em cicatrizes e outros sítios, podendo manter e disseminar a doença por um tempo desconhecido (MARZOCHI et al., 1999). Assim, a

identificação precoce de portadores sãos, pacientes com doença ativa, assim como pessoas com lesões cicatriciais e/ou história prévia de LTA, pode se mostrar como ponto fundamental no controle desta doença.

É conhecido que infecção e subsequente cura podem produzir imunidade em muitos casos, o que suporta a idéia de que imunização com uma vacina apropriada poderia obter sucesso na prevenção desta doença (SCOTT, 1990). Entretanto, nenhuma vacina é comercialmente disponível, a despeito de inúmeros trabalhos reportados (NASCIMENTO et al., 1990; HOMMEL et al., 1995; MODABBER, 1995; DOWLATI et al., 1996; GENARO et al., 1996; PAPADOPOULPOU et al., 1998; SJOLANDER et al., 1998). O desenvolvimento de vacinas contra diferentes espécies parece ser uma estratégia promissora (SCOTT, 1990).

Para melhorar o controle da leishmaniose o desenvolvimento de alguns pontos ainda será necessário. Validação de métodos diagnósticos parasitológicos não invasivos assim como descentralização dos mesmos aumentando a probabilidade de detecção precoce e diagnóstico de certeza; pesquisa de novas drogas que permitam tratamento seguro, de fácil administração (preferencialmente por via oral), curto prazo e mais barato; assim como identificação de sistema de vigilância e estratégias de controle com maior custo-efetividade (MARZOCHI et al., 1999). Maior suporte financeiro aos programas de controle e estratégias almejando modificações comportamentais parecem ser relevantes (KLAUS et al., 1999). A educação em saúde, aumentando a conscientização da população exposta a fim de promover o controle comunitário de vetores e reservatórios, pode ser importante na redução tanto da densidade de flebótomos intradomiciliares quanto da incidência anual de casos entre susceptíveis.

2.8 PCR

2.8.1 PCR: GENERALIDADES

A reação em cadeia de polimerase, ou reação de polimerização em cadeia (PCR), é uma técnica molecular que permite a amplificação do DNA “in vitro”, através de uma reação enzimática catalizada pela DNA polimerase. Esta enzima cataliza a síntese do polímero de ácido nucléico complementar usando uma cadeia precursora como molde.

A PCR reproduz laboratorialmente o processo de replicação natural de DNA, o que somente é possível devido à descoberta do *Thermus aquaticus*, uma espécie de bactéria que sobrevive em altas temperaturas em termas naturais. Desta bactéria extrai-se uma DNA polimerase, a Taq DNA polimerase, capaz de resistir aos agressivos ciclos térmicos usados durante a realização da PCR (ANDRADE, L.E.C., 1993).

A PCR se dá em três fases: desnaturação, anelamento ou hibridização, e extensão ou polimerização propriamente dita. Na primeira fase ocorre a separação da fita dupla do DNA em duas fitas únicas, promovida por elevação da temperatura em graus variáveis, entre 90° e 95°. Na segunda fase, se dá a demarcação das extremidades do DNA de interesse nas duas fitas resultantes da fase anterior. A polimerase, para desempenhar seu papel de polimerização, necessita de um fragmento de DNA previamente ligado na região escolhida com antecedência, e para isto utiliza-se um iniciador ou “primer”. “Primers” são pequenos fragmentos de DNA de fita simples sintetizados “in vitro” a partir de uma sequência de oligonucleotídeos previamente conhecida, a fim de que uma perfeita hibridização com os pares de base da fita do DNA estudado ocorra. Somente haverá amplificação de DNA se houver

hibridização do “primer” com um segmento do DNA da amostra, o que confere especificidade à reação. Esta fase da reação requer uma temperatura em torno de 45° a 60°. A terceira e última etapa é iniciada quando o “primer” já se encontra ligado aos segmentos complementares. A polimerase liga os nucleotídeos entre si, completando a fita simples, e transformando-a em dupla, promovendo sua extensão. A partir daí ocorre uma reação em cadeia, sendo que os fragmentos de DNA recém-formados fornecem mais moldes para a montagem de novas fitas nos ciclos subseqüentes (ANDRADE, 1993; HIRATA & HIRATA, 1997). Atualmente este procedimento é totalmente automatizado em um aparelho denominado termociclador, programado para ajustar tempo, temperatura e número de ciclos específicos para o objetivo que se pretende alcançar.

O amplificado produzido pela reação pode ser analisado por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, utilizada na separação e caracterização dos fragmentos de DNA obtidos. O gel de poliacrilamida é bastante utilizado quando os fragmentos obtidos são menores que 1 kb (HIRATA & HIRATA, 1997).

Esta ferramenta diagnóstica, PCR, encontra-se evolutivamente em desenvolvimento, com inovações freqüentes. Problemas técnicos ainda são factíveis de ocorrer, como: extrema sensibilidade e ocorrência de contaminação, ocasionando resultados falso-positivos; e presença de substâncias inibidoras de amplificação presentes na amostra, ocasionando resultados falso-negativos. Com a finalidade de diferenciar resultados falso-negativos, tratamentos mais refinados das amostras têm sido desenvolvidos, assim como inclusão de controles positivos na reação (DEGRAVE et al., 1994). Outra causa de falso-negativos é a escolha de “primers” com grande concentração dos pares de nucleotídeos guanina-citosina (gc, maior que

50%), uma vez que sua ligação se dá por ponte tripla de hidrogênio, o que caracteriza uma ligação mais forte e, portanto, mais difícil de sofrer o processo de desnaturação, necessitando de um tempo maior para se atingir uma temperatura mais alta capaz de romper esta ligação. Isto pode levar a uma desnaturação incompleta, reduzindo a possibilidade de hibridização, com conseqüente redução do rendimento do produto da PCR (HIRATA & HIRATA, 1997).

No controle de resultados falso-positivos, os reagentes utilizados no sistema devem ser otimizados, mantendo sua qualidade e pureza, concentrações padronizadas e pH balanceado, constantes de uma reação à outra. Desequilíbrio neste sistema pode provocar aparecimento de dímeros geradores de confusões diagnósticas, e podem ser evitadas com a manutenção de um ritual padronizado na realização de todas as etapas manuais, assim como técnicas especiais de anelamento inicial no programa do termociclador. Outra causa de resultados falso-positivos é a contaminação por “amplicons”, evitada pelas seguintes alternativas: áreas separadas para preparo de amostras, realização do PCR, e manipulação do amplificado; utilização de material de laboratório estéril e específico apenas para os experimentos; pipetas e micropipetas especiais para evitar contaminação com aerossóis; separar todos os reagentes a serem utilizados em alíquotas e desprezá-los à menor suspeita de contaminação; preparar a reação em fluxo laminar e utilizar lâmpada ultravioleta (UV) antes e depois de cada procedimento, assim como métodos químicos como hipoclorito de sódio na destruição de “amplicons” (DEGRAVE et al., 1994; BELLI et al., 1998).

Sabe-se que existe uma grande variabilidade de seqüências de DNA, que constituem os mini e microsátélites. Estes são seqüências curtas, repetidas

consecutivamente ao longo dos cromossomos, caracterizando o chamado polimorfismo de DNA. Assim, cada indivíduo, ou espécie, terá um padrão ou perfil de DNA, DNA “fingerprinting”, que são usados para se estabelecer identificações mais precisas. A análise do polimorfismo de DNA por PCR é realizada a partir de primers adjacentes a uma determinada região polimórfica, tornando possível amplificar um segmento de DNA que poderá ser analisado por seqüenciamento do DNA, por clivagem com endonucleases de restrição (RFLP), ou por hibridização com sondas moleculares (HIRATA & HIRATA, 1997).

A partir da década de 90 a técnica de PCR foi introduzida no diagnóstico de doenças infecciosas, inicialmente aplicada a agentes bacterianos. Na atualidade, esta ferramenta é utilizada para diagnóstico e classificação de todos os agentes microbiológicos, como vírus, fungos e parasitas, assim como na avaliação prospectiva de determinadas doenças como Hepatite e AIDS.

A análise molecular da *Leishmania* tem sido alvo de diversos estudos no mundo inteiro, com aplicações práticas no diagnóstico, tratamento, prevenção e avaliação de variação genética de suas espécies em estudos de taxonomia (FLOETER-WINTER & ULIANA, 1993; DEGRAVE et al., 1994; CRUZ & TOSI, 1996; BELLI et al., 1998).

2.8.2 PCR NO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Determinadas espécies de parasitas, como *Leishmania* e *Trypanosoma*, possuem uma organela denominada cinetoplasto, que é um tipo de mitocôndria característica, rica em DNA (kDNA) que se encontram na forma de milhares de círculos entrelaçados. Na *Leishmania* estes círculos compreendem dois componentes, os minicírculos e os maxicírculos. Os maxicírculos encontram-se em menor

quantidade, são pouco heterogêneos e variam de tamanho entre 20 e 40 pares de base (pb) presentes em 30 a 50 cópias. Carream genes que codificam RNA ribossomal (RNAr), e expressam proteínas através de um processo bastante complexo. Já os minicírculos são milhares de círculos cuja função genética parece estar relacionada à codificação de RNAs guias (RNAg) que controlam a especificidade de edição do RNA. São mais heterogêneos e têm aproximadamente 750 a 850 pb e suas moléculas estão presentes no kDNA da *Leishmania* em grande número de cópias (cerca de 10.000 moléculas por célula). Contêm uma região conservada de no mínimo 120 pb que podem ser evidenciadas em cada molécula de diferentes espécies de *Leishmania*, enquanto as regiões restantes variam entre as espécies (CRUZ & TOSI, 1996; RODRIGUES, 2000).

Pelos motivos expostos acima, presença em múltiplas cópias e composição por região conservada e regiões variadas, os minicírculos de moléculas de kDNA têm sido alvo na realização de técnicas moleculares objetivando diagnóstico geral e específico, subgênero e espécies, de infecções causadas por *Leishmania*, permitindo grande sensibilidade e especificidade (DEGRAVE et al., 1994; BHATTACHARYYA et al., 1996; CRUZ & TOSI, 1996; RODRIGUES, 2000; WEIGLE et al., 2002).

As amostras a serem analisadas podem ser procedentes tanto de material cultivado (DE BRUJIN et al., 1992; MACEDO et al., 1992; GUEVARA et al., 1992; FERNANDES et al., 1994; ULIANA et al., 1994; BHATTACHARYYA et al., 1996; AVILES et al., 1999; BRENIÉRE et al., 1999; PIÑERO et al., 1999; GRISARD et al., 2000; ANDRADE et al., 2001; VOLPINI et al., 2001), quanto de sangue (BELLI et al., 1998; PIÑERO et al., 1999), e de material congelado (DE BRUJIN et al., 1992;

DE BRUIJN et al, 1993; DEGRAVE et al., 1994; BELLI et al., 1998; HARRIS et al., 1998; AVILES et al., 1999; PASSOS et al., 1999; MARQUES et al., 2001; ROMERO et al., 2001; WEIGLE et al., 2002), estocado em formol (MIMORI et al., 1998; MIMORI et al., 2002; WEIGLE et al., 2002), em papel filtro (MARQUES et al., 2001), em nitrocelulose (ANDRADE et al., 2001; MARQUES, 2001), em etanol (MARQUES, 2001; MIMORI et al., 2002), e em parafina (LASKAY et al., 1995; SCHUBACH et al., 1998; UEZATO et al., 1998).

A análise molecular permite a identificação da *Leishmania* e suas espécies envolvidas na etiologia da leishmaniose cutânea através técnicas de PCR (WILSON, 1995; CRUZ & TOSI, 1996), pela geração de “primers” específicos usando kDNA (BHATTACHARYYA et al., 1996; BRENIÈRE et al., 1999; PASSOS et al., 1999; ANDRADE et al., 2001; ROMERO et al., 2001), RNA ribossomal (GUEVARA e al., 1992; ULIANA, 1994), e mini-exon (FERNANDES et al., 1994; GRISARD et al., 2000). Os dois primeiros alvos contêm regiões que variam em homologia entre as diferentes de *Leishmania*. “Primers” direcionados para amplificar minicírculos apresentam maior sensibilidade (RODGERS et al., 1990; DEGRAVE et al., 1994), enquanto aqueles direcionados para mini-exon apresentam maior especificidade na detecção de subgêneros e espécies perdendo para os primeiros em sensibilidade (DEGRAVE et al., 1994; FERNANDES et al., 1994).

O gene de mini-exon está presente no genoma nuclear em aproximadamente 200 cópias, e consiste de três partes: um exon, um intron e uma região intergênica. O exon é uma sequência de 39 nucleotídeos altamente conservada. O intron é moderadamente conservado entre espécies do mesmo gênero ou subgênero. Já a região intergênica é muito divergente entre as diferentes espécies quanto ao tamanho

e sequência primária do DNA. Devido a esta última característica, as reações utilizando “primers” específicos para mini-exon são potencialmente úteis na diferenciação e identificação de espécies (HARRIS et al., 1998; DEGRAVE et al., 1994). Espécies do subgênero *Leishmania* possuem um fragmento de gene 0.3 kb que difere do gene 0.25 kb de espécies do subgênero *Viannia* (FERNANDES et al., 1994).

A hibridização usando sondas de DNA é descrita como sendo sensível no diagnóstico de leishmaniose. Sua vantagem é que muitas amostras podem ser processadas simultaneamente (WILSON, 1995). Alguns laboratórios de pesquisa têm detectado parasitas em amostras clínicas e em estudos de campo com sucesso, mas as sondas não têm sido muito aplicadas para detecção rotineira. Até 1990 o maior obstáculo para a aplicação da técnica era a necessidade de sondas marcadas com material radioativo (VALLI et al., 1999). Embora sistemas radioativos sejam fáceis de utilizar e fáceis de interpretar, estão associados com perigo de exposição e não podem ser incorporados em kits. A partir de 1990, sistemas químicos de luminescência tornaram-se disponíveis, os quais são baseados na detecção de sondas marcadas com haptenos e enzimas anti-haptenos conjugadas, assim como substratos químicos de luminescência especialmente desenhados (WILSON, 1995). A principal vantagem dos sistemas químicos de luminescência é a estabilidade das sondas, o que permite sua preparação em grande quantidade, controle de qualidade, e inclusão em kits. Entretanto, o uso de sondas de kDNA em técnicas de hibridização possui um baixo limite de detecção (100 – 1000 parasitas por amostra clínica), o que pode limitar sua utilização no diagnóstico em formas tegumentares, principalmente cutâneas localizadas, pobres em parasitas (DEGRAVE et al., 1994; WILSON, 1995).

Já a PCR oferece muito maior sensibilidade, podendo detectar até uma quantidade de DNA de 1 fentograma (fg) a 10 picogramas (pg), equivalendo a 0,01 a 100 parasitas por tubo de reação, tornando esta metodologia mais adequada ao diagnóstico de formas da LC com poucas amastigotas nas lesões (DE BRUJIN & BARKER, 1992; HARRIS et al., 1998; AVILES et al., 1999; RODRIGUES, 2000).

Uma vez que PCR de minicírculos é capaz de detectar a presença da *Leishmania* fazendo diagnóstico de leishmaniose com eficiência, mas não pode distinguir, por si só, a espécie causadora de LC, subsequente hibridização do produto de PCR de gênero usando sondas moleculares subgênero-específicas tem sido empregada. PASSOS et al. (1999) caracterizaram o subgênero de amostras de biópsia de pele de 53 pacientes com diagnóstico de LC em Minas Gerais, Brasil, sendo 92,5% do tipo *Viannia* e 7,5% *Leishmania*. No mesmo Estado, ANDRADE et al. (2001), utilizando PCR e hibridização de material estocado em nitrocelulose, reportaram uma positividade e sensibilidade de 100%, com todas as amostras pertencendo ao subgênero *Viannia*.

É sabido que mais de uma espécie de *Leishmania* pode estar presente em uma mesma região (RODGERS et al., 1990; DEGRAVE et al., 1994; BRENIÈRE et al., 1999). Todavia, testar a mesma amostra com várias reações de PCR para cada espécie apresenta limitações como custo, tempo e risco de contaminação. Sendo assim, um método capaz de identificar simultaneamente uma grande variedade de espécies seria de grande validade (HARRIS et al., 1998). A PCR multiplex tem sido utilizada como método que, com uma única etapa, detecta o gênero do parasita e diferencia simultaneamente subgêneros e espécies de *Leishmania*, empregando um “primer” gênero específico associado a vários “primers” com região variável

específica para cada uma delas (BELLI et al., 1998; AVILES et al., 1999). Uma das suas potenciais aplicações é a detecção de infecções mistas, causadas por parasitas de diferentes complexos (HARRIS et al., 1998). Apresenta sensibilidade de 0,01 a 100 parasitas (HARRIS et al., 1998), e alto potencial em detectar infecções mistas, ou seja, causadas por diferentes espécies de *Leishmania*. Para amplificação podem ser utilizadas amostras de culturas ou amostras de tecidos obtidas por biópsias, raspado (BELLI et al., 1998) ou aspirado. Esta técnica pode utilizar como alvo tanto a região de mini-exon (HARRIS et al., 1998), quanto a região de mini-círculos de kDNA (BELLI et al., 1998; AVILES et al., 1999).

Também com a finalidade de identificar o agente e distinguir as diversas espécies de *Leishmania*, métodos de PCR que usam oligonucleotídeos complementares a seqüências conservadas de pequenas subunidades de RNA ribossomal (SSUrRNA) têm sido descritos. Para tal objetivo, após a amplificação realiza-se hibridização com sondas de oligonucleotídeos não radioativos espécie ou grupo específicos, que reconhecem pontos de mutação no produto amplificado, e podem ser utilizados em estudos de campo (ULIANA et al. 1994).

Análise de DNA “fingerprinting”, ou análise de polimorfismo de DNA genômico de *Leishmania*, pode ser usada para caracterização e identificação de variações micro-satélites intra e interespecíficas, a partir de um único “primer” inespecífico. O número e tamanho de produtos amplificados, ou seja, o grau de polimorfismo do produto de PCR, é característico de determinados grupos de espécies, ou subgêneros, podendo ser usados na categorização taxonômica das mesmas (MACEDO et al., 1992; SCHÖNIAN et al., 1996; RODRIGUEZ et al., 1997; MIMORI et al., 1998; BRENIÈRE et al., 1999; RUSSEL et al., 1999).

Uma outra técnica de PCR, a análise de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), tem sido reportada na determinação de espécies de *Leishmania*, porém requer DNA purificado e condições altamente standardizadas para sua realização, além de resultar muito menos sensível do que a PCR padrão (NOYES et al., 1996), detectando uma quantidade de DNA equivalente a 1 a 10 ng (HARRIS et al., 1998).

VOLPINI et al. (2001) empregaram uma técnica de PCR baseado em seqüências simples repetidas (SSR-PCR) para amplificar seqüências genômicas micro-satélites na diferenciação de espécies de *Leishmania*, e compararam esta técnica com PCR-RAPD. Concluíram que o método pode ser utilizado na distinção entre as espécies testadas, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, e *L. (L.) chagasi*, em isolados de cultura. Entretanto, apesar de mais preciso e mais reproduzível do que RAPD, a SSR-PCR não pode ser utilizada para diferenciar *Leishmania* de espécimes clínicos, porque sofre interferência do DNA do hospedeiro presente neste tipo de material.

A sensibilidade e a especificidade da PCR têm se mostrado variáveis, na dependência da seqüência iniciadora utilizada, experiência de quem realiza o exame, e condições adequadas de laboratório (DEGRAVE et al., 1994). Um par de “primers” amplificando minicírculos de kDNA, um gênero específico e outro subgênero ou espécie específico, pode ser utilizado seqüencialmente proporcionando um diagnóstico mais completo de LC, sem necessidade da aplicação de técnicas específicas de hibridização (DE BRUJIN & BARKER, 1992). Em um estudo com amostras de tecido congelado de 20 pacientes (DE BRUJIN et al., 1993), a PCR com “primer” de minicírculos apresentou 84,6% (11 de 13) de positividade comparada

com 38,5% (5 de 13) de positividade de exame de esfregaço e 38,5% (5 de 13) de positividade de cultura de aspirado. Este mesmo estudo apresentou 81,8% (9 de 11) de positividade da PCR contra 63,5% (7 de 11) de positividade de cultura “in vitro” de material biopsiado e 54,5% (6 de 11) de positividade de inoculação em “hamster” do material biopsiado. Esta comparação de métodos ficou prejudicada devido à falta de definição do padrão ouro, assim como ao tamanho da amostra. Neste trabalho, a especificidade foi de 60,0%, o que poderia ser explicado pela presença de parasitas em pacientes com infecção subclínica, contaminação de tubos da reação, ou de qualquer instrumento e reagentes usados na obtenção e processamento dos tecidos ou no preparo da própria reação.

AVILES et al. (1999), usando amostras de tecido a fresco e macerado de biópsia de lesão de LC, e tendo cultura positiva ou associação de dois ou mais testes positivos como diagnósticos de certeza, reportaram que a PCR usando concomitantemente “primers” amplificadores de região 120 pb e 70 pb de minicírculos, foi mais sensível que cultura, microscopia, exame histológico e ELISA, com sensibilidade de 92%, 46%, 42%, 33%, e 20%, respectivamente, com uma especificidade de 100%. DNA extraído de amostras congeladas de biópsias de lesões cutâneas também submetidas a PCR com “primer” de minicírculos mostrou sensibilidade de 100% em estudo brasileiro realizado em Manaus (ROMERO et al., 2001), e a mesma sensibilidade foi reportada por BELLI et al. (1998), com especificidade de 100% comparadas com exame direto. Estes autores compararam resultados de exame direto e PCR de material coletado através de raspado de lesão cutânea, encontrando positividade de 67,1% no primeiro e 100% no segundo método, concluindo que, além de PCR ter sido mais sensível do que exame microscópico, a

técnica de raspado foi tão eficiente quanto biópsia na realização deste exame, com as vantagens de não ser invasivo e não apresentar complicações locais, como dor e infecções iatrogênicas, decorrentes do procedimento. Interessantemente, MIMORI et al. (2002) alcançaram uma sensibilidade de 93,8% com uma PCR de exsudato de úlcera de 16 casos de LC coletado por swab, um método fácil, indolor, que se mostrou mais eficaz do que cultura “in vitro” (40% de positividade) e exame direto (14,3%).

FERNANDES et al. (1994) usaram PCR para amplificar os genes repetidos de mini-exon de 18 cepas de *Leishmania*, e evidenciaram que as espécies dermatrópicas de subgênero *Leishmania* possuem um gene 0,3 kb que difere do gen 0,25 kb de espécies de subgênero *Viannia*, concluindo que esta técnica pode ser utilizada em análise comparativa e de diagnóstico específico da leishmaniose. A utilização de PCR de mini-exon possibilitou diagnóstico de LC em quatro casos autóctones em região considerada não endêmica do sul do Brasil. Este método foi útil na detecção e caracterização dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, confirmados por uso de Ac monoclonal e isolamento através de inoculação em “hamster” (GRISARD et al., 2000). Sensibilidade e especificidade de 100% foram detectadas em PCR multiplex amplificando mini-exon de 30 pacientes encaminhados ao Centro Nacional de Diagnóstico da Nicarágua, 20 com diagnóstico de LC confirmado por cultura e também por PCR, e 10 com outros diagnósticos PCR negativos (HARRIS et al., 1998).

Diferentes formas de preservação de amostras clínicas para extração de DNA e realização de PCR foram testadas em outro estudo brasileiro: papel filtro, nitrocelulose, etanol, amostra congelada e associações das mesmas (MARQUES et.

al., 2001). Foram estudados 164 pacientes com diagnóstico suspeito de LC, sendo 81,1% confirmados por exame parasitológico associado ou não a IDRM. PCR com primer de minicírculos foi positivo em 76,8% dos casos suspeitos, e 90,2% dos casos confirmados. Ocorreu uma variação de sensibilidade entre as diversas formas de estoque que não foi estatisticamente significativa (73,3% a 82,2%), porém, devido à facilidade de coleta, transporte e preservação, os autores recomendam utilização de papel filtro e de nitrocelulose principalmente para condições de campo.

Amostras de biópsia fixadas em formol também têm sido empregadas no diagnóstico de LC por PCR, com um benefício extremo no que se refere à facilidade de realização do procedimento e de transporte sem necessidade de processamento do material e de refrigeração (MIMORI et al., 1998; WEIGLE et al., 2002).

A PCR em material incluído em parafina também tem sido avaliada, tendo sido eficaz em detectar kDNA em 53% de 20 pacientes com diagnóstico de LC confirmado por cultura, e 48% de casos suspeitos de leishmaniose lupóide (WEIGLE et al., 2002), podendo os casos falso-negativos serem atribuídos à pobreza de estabilidade de DNA neste material, existindo ainda a possibilidade de perda de DNA durante métodos de extração da parafina (WEIGLE et al., 2002).

A importância da escolha do local da lesão ulcerada a ser biopsiado também tem sido avaliada. Estudo colombiano envolvendo 115 pacientes com LC encontrou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na sensibilidade da PCR quando o material usado como amostra foi coletado do centro ou da borda da lesão, com 83,3% e 77,8% de positividade respectivamente, concluindo que as amastigotas estão mais abundantemente detectáveis na primeira região (RAMIREZ et al., 2000), embora usualmente a recomendação para coleta de material para diagnóstico de LC

seja a oposta (MARZOCHI et al., 1999; SALMAN et al., 1999; Ministério da Saúde/Brasil, 2000; PEARSON et al., 2000; WHO, 2002).

PCR de lesões crônicas de LC foi duas vezes mais sensível do que os métodos convencionais, sendo considerado método de escolha no diagnóstico deste tipo de lesões em estudo de amostras de 44 pacientes com diagnóstico de LC crônica (mais de 6 meses de duração). A positividade foi de 45,5%, enquanto positividade de cultura variou de 4,5% a 22,7% na dependência da forma de coleta de amostra (WEIGLE et al., 2002).

Uma das grandes dificuldades na validação das técnicas de PCR no diagnóstico de Leishmaniose tegumentar de uma maneira geral encontra-se na necessidade de um grande número de biópsias de controle obtidas de pessoas saudáveis para verificar a especificidade deste método (BERMAN, 1997). Embora rápido e de tecnologia sólida, a PCR apresenta problema de praticidade e custo, além do fato de que, também aqui, o padrão ouro usual continua sendo baseado em técnicas parasitológicas de identificação do agente. Todavia, estudo de validação da PCR no diagnóstico de LTA realizado em Pernambuco, Brasil, detectou 11 casos de pacientes positivos por esta técnica e negativos por técnicas consideradas padrão, com um limiar de detecção de 1 pg em PCR gênero específica (RODRIGUES, 2000). BELLI et al. (1998) detectaram uma positividade adicional de 25% aos resultados obtidos com exame direto em raspado de lesões cutâneas, demonstrando uma maior sensibilidade da PCR.

Portanto, além de sua grande utilidade no diagnóstico específico de subgêneros e espécies de *Leishmania* causadoras de LC, devido à alta sensibilidade da PCR, esta ferramenta poderia ser vista como alternativa no diagnóstico de lesões

cutâneas com grande suspeição mas cujos resultados são negativos através de métodos diagnósticos clássicos. Este fato ocorre com maior frequência entre pacientes com doença de longa evolução clínica, pacientes que iniciaram tratamento específico antes da coleta de material para exames, e em casos de recaídas ou recidivas de pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* (SCHUBACH et al., 1998; ROMERO et al., 2001).

A PCR pode ser utilizada para detectar o parasita em biópsias ou raspado de lesão cutânea e aspirado linfático de pacientes clinicamente diagnosticados, frequentemente com maior sensibilidade do que cultura ou microscopia (WILSON, 1995), podendo oferecer um resultado no próprio dia em que a amostra foi colhida (DE BRUJIN et al., 1993). Mesmo após terapia o parasita poderá ser identificado na cicatriz (OLIVEIRA-NETO et al., 1998; SCHUBACH et al., 1998) ou sangue (QIAO et al., 1995; BELLI, et al., 1998). *Leishmania (V.) braziliensis* tem sido detectada por PCR em sangue periférico de 10 a 30 anos após tratamento e cicatrização de lesões, demonstrando que a completa erradicação de parasitas dificilmente é adquirida (BELLI et al., 1998), o que sugere aplicação deste método na monitorização sanguínea de *Leishmania (V.) braziliensis* e também em cicatrizes, como possível fator preditor de recaídas, e avaliação de eficiência de regimes terapêuticos na eliminação dos parasitas (WILSON, 1995; BELLI et al., 1998).

Uma vez que dispensa uso de biópsia, tem a possibilidade de utilizar raspado e aspirado de lesões, assim como coleta de sangue, a PCR permite seguimento de tratamento, configurando-se em método pouco invasivo, e tornando possível seu emprego em futuros estudos sobre testes que podem servir como avaliadores de critérios de cura (DEGRAVE et al., 1994).

Com o uso da PCR também podem ser identificadas cepas de *Leishmania* em diversos tipos de amostras do paciente com LC, além de poder ser aplicada a vetores e reservatórios animais, proporcionando correlações epidemiológicas importantes na identificação de focos de transmissão ativa e novas ferramentas nas estratégias de controle da LC (GRIMALDI & TESH, 1993; DEGRAVE et al., 1994; WILSON, 1995; PASSOS, 1996; BELLI et al., 1998; RODRIGUEZ et al., 1999). Assim, além de ser uma técnica sensível e ágil, a PCR tem ainda a vantagem de poder ser adaptada a condições de campo através de simplificação de sua técnica com possível redução de custos (BELLI et al., 1998; MARQUES et. al., 2001).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Nós realizamos um estudo experimental em diagnóstico molecular de leishmaniose, executado com material estocado de biópsia de pele de pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea.

3.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Após aprovação pela comissão de ética da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo (USP) e do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM), o estudo foi realizado com amostras estocadas de pacientes residentes nos municípios da Grande Vitória, Estado do Espírito Santo, com diagnóstico de leishmaniose cutânea, os quais procuraram o ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) do HUCAM, localizado na cidade de Vitória, Espírito Santo, Brasil, nos períodos de 1997 e 1998.

3.3 AS AMOSTRAS

Foram selecionadas 71 amostras (anexo A: Figura 8) de material estocado obtido através de biópsia de lesões de pacientes com diagnóstico de leishmaniose

cutânea realizado através da associação de critérios clínicos aos métodos tradicionais de pesquisa direta de amastigotas e reação de Montenegro, atendidos no ambulatório de DIP do HUCAM, Vitória, ES, Brasil. Cinquenta e oito amostras estocadas em parafina foram cedidas pelo setor de Patologia do HUCAM (Dr Elton Lucas), e 13 amostras fixadas em formol a 10% cedidas pelo banco de amostras do ambulatório de DIP do HUCAM (Dr Aloísio Falqueto).

3.4 CRITÉRIOS DIAGNÓSTICO DE LC PARA INCLUSÃO DE AMOSTRAS NO ESTUDO

Através de análise de dados do prontuário médico, os seguintes critérios foram utilizados para inclusão de amostras no estudo:

- Diagnóstico de LC:
  - Lesão clássica: úlcera, única ou múltipla, indolor, ou pouco dolorosa, com bordas elevadas e aspecto de moldura, ou vulcânico, de fundo granuloso ou exsudativo;
  - Lesões menos habituais como: úlcero-crostosas, úlcero-vegetante, verrucosa, nodular, liquenóide, ou framboesiforme; desde que afastados outros diagnósticos;
  - Epidemiologia positiva;
  - IDRM positiva ou negativa;
  - Exame parasitológico direto positivo.

3.5 CONTROLE NEGATIVO

Vinte e uma amostras fixadas em formol foram incluídas como controle negativo, com diagnósticos de: esporotricose, ulcera vascular, impetigo e lesões ulceradas inespecíficas.

3.6 OBTENÇÃO DE DADOS DEMOGRÁFICOS E RESULTADOS DE EXAMES DIAGNÓSTICOS

Os dados demográficos e aqueles que diziam respeito aos critérios diagnósticos dos pacientes com LC incluídos no estudo foram obtidos através de criteriosa revisão de prontuários médicos, com preenchimento de formulário de coleta, disposto no anexo B.

3.7 IMUNOHISTOQUÍMICA E SEMIQUANTIFICAÇÃO DO PARASITISMO

As amostras estocadas em parafina foram submetidas a cortes de 4 μ e preparadas em lâminas com solução adesiva de silano. As lâminas foram incubadas com peróxido de hidrogênio 3% para bloquear a peroxidase endógena, e incubadas com anticorpo policlonal anti-*Leishmania*. O material foi lavado com solução de PBS, pH 7,2 e incubado com anticorpo secundário. Após 2 lavagens com PBS procedeu-se incubação com o complexo estreptavidina-biotina diluído em PBS (1:1000) por 30 minutos a 37°, passando posteriormente por duas novas lavagens em PBS e revelado com diaminobenzidina 1 mg/ml e H₂O₂ 0,01%, com incubação e monitoramento visual da reação. Finalizando, o material foi lavado em água corrente,

contracorado com hematoxilina, desidratado com álcool e xilol, e montado em resina.

Para avaliação semiquantitativa do parasitismo, os preparados histológicos obtidos após a imunohistoquímica foram analisados por dois observadores independentes. Em cada amostra foi determinada a prevalência de antígeno de amastigotas corados nos campos dérmicos de áreas inflamadas, em 3 campos no aumento de 400 vezes. Foram empregados os seguintes critérios para semiquantificação: discreto com 1 a 20 amastigotas por 3 campos, moderado com 21 a 40 amastigotas por 3 campos, intenso com 41 a 80 amastigotas por 3 campos.

3.8 EXTRAÇÃO DE TECIDO ESTOCADO EM PARAFINA E FORMOL

Antes da extração do DNA, cortes de 4 μ das amostras estocadas em parafina foram submetidos a tratamento com xilol, a fim de extrair toda parafina, por homogeneização em vórtex junto com 1 ml de xilol. A suspensão era centrifugada a 13.000 rpm por 7 minutos, tendo o sobrenadante descartado e o precipitado submetido ao mesmo processo por mais duas vezes. Para extração do xilol residual, o precipitado foi suspenso em 1 ml de etanol 70% e re-centrifugado a 13.000 rpm por 7 minutos, por duas vezes, sendo finalmente o precipitado seco durante aproximadamente 15 minutos. O “pellet” obtido foi re-hidratado em TE (tampão Tris/EDTA- ácido ethylenediamino tetra-acético). As amostras de tecido fixadas em formol a 10% foram divididas ao meio e suspensas em 200 μ l de TE, centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos, por duas vezes, e novamente suspensas em TE.

3.9 EXTRAÇÃO DE DNA

Todas as amostras foram submetidas à extração e purificação de DNA com protocolo de fenol/clorofórmio e posteriormente com Kit comercial QUIamp (QIAGEN Co), conforme orientação do fabricante.

O material foi re-suspenso com 200µl de TE e digerido com adição de 0,8 µl de proteinase k (20mg/ml) e 10 µl de SDS 20% (Sódio Duodecil Sulfato), com incubação em banho-maria a 42° durante 1 hora. A seguir, as proteínas foram precipitadas e extraídas com fenol 250 µl e clorofórmio 250 µl, com separação das fases por centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos, desprezando-se a fase orgânica inferior e transferindo a fase superior aquosa para outro tubo. Em seguida, o mesmo processo foi realizado com 500 µl de clorofórmio, e à fase aquosa adicionamos 50 µl de acetato de sódio 3M pH=7 e 1000 µl de etanol 100% gelado para precipitação do DNA, mantendo a -20° durante 2 horas, com recuperação por centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos, e 4 lavagens do precipitado com 500 µl de etanol 70% e centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, todas as amostras, independente da forma de estoque, foi submetido à extração com o kit QIAGEN para purificação final antes da realização do PCR.

3.10 PCR DE GÊNERO E SUBGÊNERO

Os “primers” usados nesta fase do estudo foram desenvolvidos e padronizados pela bióloga Byanca Paiva, colaboradora do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo (FMUSP), ainda não publicados. Os “primers” são específicos para região de mini-exon de *Leishmania*, e foram desenvolvidos

utilizando-se os programas de domínio público Primer 3 e Blast. Foram utilizados dois “primers” em experimentos seriados: um “primer” específico para o gênero *Leishmania*, e um “primer” específico para o subgênero *Viannia* (quadros 4 e 5). As seqüências completas utilizadas na construção dos primers podem ser vistas na figura 9 (anexo C).

Quadro 4 - Características do “primer” de mini-exon para gênero *Leishmania*

“Primer”	Seqüência	mer	tm	gc (%)	pb
Gênero(sense)	5’cgtcttcggaacattt3’	18	59,65	50,00	177
Gênero (anti-sense)	5’cgtagtggaagcccaagg3’	20	61,88	55,00	

NOTA: mer: número de nucleotídeos; tm: temperatura média de desnaturação; gc%: percentual de pares de bases constituídas por guanina-citosina; pb: número de pares de base

Quadro 5 - Características do “primer” de mini-exon para subgênero *Viannia*

“Primer”	Seqüência	mer	tm	gc(%)	pb
Subgênero (sense)	5’cgtcttcggaacattt3’	18	59,65	50,00	450
Subgênero (anti-sense)	5’gccgcgcgtcaccacat3’	19	74,13	73,68	

NOTA: mer: número de nucleotídeos; tm: temperatura média de desnaturação; gc%: percentual de pares de bases constituídas por guanina-citosina; pb: número de pares de base

A mistura para a reação de PCR (23µl) foi preparada com 2,5 µl de tampão (1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris –HCl pH 8.3), 200µM contendo os 4 dNTPs (deoxynucleotideo trifosfato), 1 µM do “primer”, 0,5 µl de Taq DNA polimerase (Life Technologies do Brasil), 15µl de H₂O bi-destilada deionizada estéril, e 5µl de DNA. A amplificação foi realizada em um Termociclador de DNA (Eppendorf Mastercycler Gradient), com um ciclo inicial de 95° por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 95°, 30 segundos a 55°, e 1 minuto a 73°, com um ciclo final de 6 minutos a 73°.

Controle positivo contendo DNA ou de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, e controle negativo sem DNA de *Leishmania*, assim como controles

internos sem DNA, foram adicionados em cada reação, a fim de assegurar a confiabilidade dos resultados e a ausência de contaminação.

O produto do PCR foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, correndo em tampão TBE 5X (Tris/Borato/EDTA) a 120 V, e corados em solução de nitrato de prata 0,2%.

3.11 PCR-RFLP NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES

O “primer” usado nesta fase do estudo foi desenvolvido e publicado por PASSOS et al. (1996), tendo como alvo a região constante dos minicírculos de kDNA de *Leishmania* (quadro 6), e adaptado por Ângela Volpini, bióloga da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Quadro 6 – Características do “primer” de kDNA utilizado na PCR-RFLP

“Primer”	Seqüência 5'→3'	mer°	gc%	pb
Sense	ggg (g/t)ag ggg cgt tct (g/c)cg aa	20	70	120
Anti-sense	(g/c)(g/c)(g/c) (a/t)ct at(a/t) tta cac caa ccc c	22	50	

NOTA: mer: número de nucleotídeos; gc%: percentual de pares de bases constituídas por guanina-citosina; pb: número de pares de base .FONTE: PASSOS et al., 1996.

Para a reação inicial de PCR, foi utilizado 100fg de DNA molde das cepas referência, como controle positivo, 0,75U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dUTP, dATP, dCTP, dGTP), 1,0 pmol do “primer”, em solução tampão contendo Tris-HCl 10mM pH 8,0, KCl 50mM e MgCl₂ 1,5mM para um volume final de 10µl. As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5min, desnaturação intermediária a 94° por 30 segundos, anelamento a 55° por 30 segundos, extensão intermediária a 72° por 10 segundos e, por fim, extensão final a 72°C por 5min, num total de 35 ciclos. Com

exceção do “primer” e da água deionizada, todos os outros produtos foram adicionados à solução sob a forma de pérola do kit “PCR Beads Ready to go” (Amersham Bioscences).

Os produtos amplificados pela PCR específica seguiram o seguinte protocolo para análise: após a amplificação, cerca de 3µl de cada amostra foram ressuspensos em volume igual de tampão de amostra 2X (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e ficol 15%). A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida a 6%, a 40mA em TBE no sistema de mini-gel (BIORAD). Foi utilizado como marcador de tamanho molecular o DNA do bacteriófago φX 174 digerido pela enzima HaeIII (Pharmacia®). Em seguida, os géis foram colocados em solução fixadora (etanol 10%, ácido acético 0,5%), por 15 min sob agitação, corados pelo nitrato de prata a 0,2% por 10min, lavados por 2 min em água deionizada e incubados em solução reveladora (NaOH 0,75M, formaldeído 0,1M) até o aparecimento de bandas. A reação de coloração foi interrompida pela remoção da solução reveladora e adição da solução fixadora.

A análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de DNA (RFLP) utilizando região conservada de minicírculos de kDNA empregou a enzima Hae III, com sítios de restrição específicos para *L. (V.) braziliensis* (VOLPINI et al., 2000 - patenteada no Brasil -BRPI 0004507-1), cujos produtos são dois fragmentos de DNA, um de 40 pb e outro de 80 pb.

A digestão de 5µl do produto amplificado via PCR específica, pelo “primer” da região conservada do minicírculo do kDNA (150/152), foi feita a 37°C por 3h, utilizando-se 1U da enzima HaeIII e 1µl de tampão da enzima 10X, para um volume final de 10µl de reação.

Na técnica de PCR-RFLP, 3µl dos produtos da digestão pela HaeIII foram separados e visualizados após coloração pela prata em géis de poliacrilamida a 10%, utilizando como marcador molecular o “25pb DNA Ladder” (Invitrogen, São Paulo, Brasil). O procedimento para coloração foi o mesmo realizado para os outros géis.

3.12 CONTROLE DAS CONDIÇÕES DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO EXPERIMENTAL

Em todas as etapas de realização da PCR foram adotadas medidas para prevenção de resultados falso positivos e falso negativos. A extração das amostras da parafina e do formol; a extração do DNA do tecido; o preparo da mistura de soluções, os “primers” e amostras para a reação; a manipulação do amplificado, eletroforese e revelação foram todas processadas em ambientes diferenciados. O preparo da mistura para a reação ocorreu em capela de fluxo laminar, submetida a desinfecção com álcool a 70% e lâmpada UV antes e após cada experimento. Todas as pipetas, ponteiros e outros materiais de laboratório eram utilizados especificamente para cada etapa, sendo estéreis quando indicado.

3.13 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO EXPERIMENTAL

Imunohistoquímica e semiquantificação do parasitismo por *Leishmania* executados nas lâminas do material estocado em parafina foram realizados em colaboração com as Profas Dras. Carla Pagliari e Maria Irma Seixas Duarte do Laboratório da disciplina de Patologia de Moléstias Infecciosas e Parasitárias e

Laboratório de Imunopatologia de Esquistossomose da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo (FMUSP), São Paulo, Brasil.

Toda fase experimental do estudo ligada à realização de PCR de gênero e subgênero de *Leishmania* foi desenvolvida e realizada no laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da FMUSP, São Paulo, Brasil.

Toda fase experimental do estudo relacionada ao PCR específico para espécie de *Leishmania* foi realizada em trabalho de colaboração com Ângela Volpini e Dr Álvaro Romanha, no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou- FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brasil.

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Comparações entre frequências foi feita pelo teste de Qui-quadrado e por correlação de Spearman, e citadas somente quando significativas.

4 RESULTADOS

Foram estudadas 71 amostras estocadas de espécimes clínicos obtidos por biópsia de pele de lesões de pacientes com diagnóstico clínico, epidemiológico, e parasitológico de leishmaniose cutânea, 58 incluídas em parafina (Pf) e 13 fixadas em formol (Fr). Adicionalmente, 21 amostras fixadas em formol foram utilizadas como controles negativos das reações realizadas com material similar. Controle negativo com amostras em parafina não foi realizado por dificuldades técnicas de aquisição. Todas as amostras em parafina foram obtidas durante o ano de 1997, e todas em formol no ano de 1998.

Os pacientes fontes das amostras analisadas eram procedentes dos municípios de Viana, Cariacica e Serra, sendo 78,9% da primeira localidade. A idade dos pacientes variou de 8 a 73 anos, com média de 27,1 anos, sem diferenças estatísticas entre os municípios de origem. Estratificando-se as idades, 77,5% (55) dos casos aconteceram entre pessoas com até 40 anos, 18,3% (13) entre 41 e 60 anos, e 4,2% (3) acima de 60 anos. Vinte e uma (21) crianças de até 15 anos (29,6%) fizeram parte da casuística. Houve predomínio do sexo masculino (69%) em todos os municípios, com predomínio de lesões em pernas (42,3%) em ambos os sexos.

As descrições quantitativas das frequências dos dados demográficos encontram-se na tabela 1 e as frequências de localização das lesões na tabela 2.

Conforme dados de prontuário, todas as amostras foram positivas para *Leishmania* em exame parasitológico direto, e 97,2% (57/58 Pf e 12/13 Fr) tinham IDRMs positivas. Todos os pacientes foram tratados com antimoniais, tendo a resposta terapêutica registrada em prontuário, com boa evolução e em acompanhamento ambulatorial.

4.1 PCR COM “PRIMER” DE MINI-EXON

Todas as amostras foram testadas em PCR com “primer” de mini-exon específico para o gênero *Leishmania*, com positividade geral (parafina e formol) de 59,2% (42 de 71).

PCR amplificando mini-exon específico para subgênero *Viannia* foi realizada depois de ter o “primer” padronizado e testado com isolados de cultura de *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, e *Leishmania* (*L.*) *chagasi*. Todavia, todos os espécimes clínicos testados revelaram-se negativos, tanto com DNA extraído de biópsias fixadas em formol, quanto incluídas em parafina.

Géis de poliacrilamida das reações de padronização da PCR com os “primers” de mini-exon podem ser visualizados nas figuras 10 e 11 (anexos D e E).

4.2 AMOSTRAS ESTOCADAS EM FORMOL

Treze biópsias fixadas em formol foram submetidas a PCR de mini-exon gênero específico, apresentando positividade de 46,1% (6 de 13). Gel de poliacrilamida destas reações pode ser visualizado na figura 12 (anexo F). Controles negativos, 14 casos de esporotricose confirmados por cultura, 1 lesão de impetigo ulcerada, 2 úlceras vasculares, e 4 lesões ulceradas inespecíficas, com epidemiologia

e exame direto negativos para *Leishmania*, assim como IRDM negativas foram testados. Destes, um caso de esporotricose (4,8%) foi positivo na reação de PCR.

TABELA 1 – DISTRIBUIÇÃO QUANTO AO MUNICÍPIO DE ORIGEM, SEXO, E IDADE MÉDIA, DOS PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA, FONTES DAS AMOSTRAS ESTUDADAS, ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL –1997 e 1998

MUNICÍPIO	SEXO		IDADE MÉDIA (anos)	TOTAL GERAL
	Masculino	Feminino		
Viana	38 (67,8%)	18 (32,1%)	27,8	56 (78,9%)
Cariacica	9 (75,0%)	3 (25,0%)	27,1	12 (16,9%)
Serra	2 (66,7%)	1 (33,3%)	22,7	3 (4,2%)
Total	49 (69%)	22 (31%)	27,1	71 (100%)

p: não significativo (NS)

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO QUANTO AO LOCAL DA LESÃO, SEXO, E IDADE MÉDIA, DOS PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA, FONTES DAS AMOSTRAS ESTUDADAS, ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL – 1997 e 1998

LOCAL DA LESÃO	SEXO		IDADE MÉDIA (anos)	TOTAL GERAL
	Masculino	Feminino		
Mão	2 (4,2%)	2 (8,7%)	32,0	4 (5,6%)
Perna	22 (45,8%)	8 (34,8%)	25,3	30 (42,3%)
Face/cabeça	6 (12,5%)	0	34,0	6 (8,5%)
Tronco	5 (10,4%)	2 (8,7%)	34,0	7 (9,9%)
Coxa	1 (2,1%)	3 (13,1%)	27,0	4 (5,6%)
Braço	10 (20,8%)	5 (21,7%)	31,6	15 (21,1%)
Antebraço	1 (2,1%)	0	18,0	1 (1,4%)
Pé	0	2 (8,7%)	29,5	2 (2,8%)
Abdome	0	1 (4,3%)	56,0	1 (1,4%)
Joelho	1 (2,1%)	0	22,0	1 (1,4%)
Total n (%)	48 (100%)	23 (100%)	27,1	71 (100%)

p: NS

4.3 AMOSTRAS ESTOCADAS EM PARAFINA

Estudo imunohistoquímico foi realizado apenas com as amostras incluídas em parafina devido à desintegração de material estocado em formol, o que impossibilitou sua inclusão em parafina, necessária para a realização deste exame.

Foi factível em 94,8% (55 de 58), resultou positivo em 72,7% (40 de 55) e negativo em 27,3% (15 de 55). Material das três amostras restantes (5,2%) foi insuficiente para realização deste método. O parasitismo das 40 amostras positivas foi avaliado semiquantitativamente, sendo discreto em 65% (26 de 40) das amostras, moderado em 20% (8 de 40), e intenso em 15% (6 de 40). Fotos de lâminas com imunohistoquímica positivas podem ser vista na figura 13 (anexo G).

PCR amplificando mini-exon gênero específico foi positivo em 62,1% (36 de 58) dos casos, com 19,4% destes (7 de 36) fracamente reagentes. Gel de poliacrilamida destas reações pode ser visualizado na figura 14 (anexo H).

Uma avaliação entre resultados de imunohistoquímica, parasitismo e positividade da PCR foi efetuada. A PCR foi positiva em 18,2% (10 de 15) das amostras com imunohistoquímica negativa, 23,6% (13 de 26) quando o parasitismo foi discreto e em 5,4% (3 de 6) quando intenso. Logo, nenhuma correlação significativa entre parasitismo semiquantitativo e detecção de DNA por PCR ficou estabelecida, como demonstrado na tabela 3.

PCR-RFLP amplificando minicírculos de kDNA também foi realizado apenas nas amostras incluídas em parafina já que houve perda de integridade do tecido em formol, impedindo a aplicação desta técnica. Das 58 amostras testadas todas resultaram em amplificação do DNA específico para o gênero *Leishmania*, com positividade de 100%, (anexo I: figura 15).

Todas as amostras estudadas com a técnica de PCR-RFLP através da digestão do amplificado pela enzima Hae III resultaram em bandas com 40pb e 80 pb à eletroforese, o que caracteriza a identificação do agente etiológico como *Leishmania (V.) braziliensis* (anexo J: figura 16).

TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DA PCR AMPLIFICANDO MINI-EXON GÊNERO ESPECÍFICO COM O PARASITISMO SEMIQUANTITATIVO À IMUNOHISTOQUÍMICA DAS BIÓPSIA INCLUÍDAS EM PARAFINA, DE PACIENTES DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL – 1997 e 1998

PCR	PARASITISMO A IMUNOHISTOQUÍMICA				
	Negativo	Discreto	Moderado	Intenso	TOTAL GERAL
Negativo	5 (9,1%)	8 (14,6%)	4 (7,4%)	3 (5,4%)	20 (36,4%)
Fracamente positivo	0	5 (9,1%)	2 (3,6%)	0	7 (12,7%)
Positivo	10(18,2%	13(23,6%)	2 (3,6%)	3 (5,4%)	28 (50,9%)
Total (%)	15 (27,3%)	26 (47,3%)	8 (14,6%)	6 (10,9%)	55 (100%)

p: NS

4.4 COMPARAÇÃO DO RENDIMENTO DA PCR AMPLIFICANDO MINI-EXON GÊNERO ESPECÍFICO ENTRE AS AMOSTRAS ESTOCADAS EM FORMOL E PARAFINA

Das amostras avaliadas no estudo, 81,7% (58 de 71) estavam incluídas em parafina e 18,3% (13 de 71) fixadas em formol.

Dentre as amostras negativas, 75,9% (22 de 29) faziam parte do grupo de amostras em parafina. Entretanto, 85,7% (36 de 42) dos resultados positivos também pertenciam a este grupo. Comparação estatística entre as duas modalidades de

estoque de material não pode ser conclusiva devido às diferenças de tamanho dos grupos de amostras. Uma análise descritiva pode ser vista na tabela 4.

TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO COMPARATIVA DOS RESULTADOS DE PCR AMPLIFICANDO MINI-EXON GÊNERO ESPECÍFICO ENTRE AMOSTRAS ESTOCADAS EM FORMOL E PARAFINA DE BIÓPSIAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA, NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL – 1997 E 1998

FORMA DE ESTOQUE	PCR		TOTAL
	Negativo	Positivo	GERAL
Parafina	22 (75,9%)	36 (85,7%)	58 (81,7%)
Formol	7 (53,8%)	6 (14,3%)	13 (18,3%)
TOTAL (n)	29 (40,8%)	42 (59,2%)	71 (100%)

p: NS

4.5 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS UTILIZADOS PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Todas as amostras obtidas de biópsias haviam sido submetidas previamente a exame direto e IDRM.

Durante o estudo, imunohistoquímica, PCR específico para gênero utilizando “primer” de mini-exon e “primer” de mini-círculos de kDNA foram realizados com as amostras incluídas em parafina. Como exame direto foi o padrão ouro utilizado na seleção das amostras para inclusão no estudo, obviamente sua positividade foi de 100%, não podendo ser considerado em análises comparativas. IDRM foi positiva em 98,3% (57 de 58) dos casos.

Imunohistoquímica foi capaz de identificar a infecção por *Leishmania* em 68,9% (40 de 58) das lâminas avaliadas e 72,7% (40 de 55) das exequíveis (tabela 5).

PCR com “primer” de mini-exon teve um rendimento de 62,1% (36 de 58), enquanto a PCR de kDNA foi positiva em 100% (58 de 58) das amostras (tabela 5).

Conforme descrito, as amostras obtidas de biópsias fixadas em formol não foram analisadas em imunohistoquímica e PCR com “primer” de kDNA. IDRM foi negativa em 7,7% (1 de 13) dos pacientes fontes destas amostras. PCR com “primer” de mini-exon teve um rendimento de 46,2% (6 de 13) neste grupo de amostras (tabela 6).

TABELA 5 - RESULTADOS DOS DIFERENTES MÉTODOS DIAGNÓSTICOS REALIZADOS COM AMOSTRAS DE BIÓPSIA INCLUÍDA EM PARAFINA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA, NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL –1997 E 1998

Resultados	EXAME				
	DIRETO	IDRM	IH	PCR 1	PCR 2
Positivo	58 (100%)	57 (98,3%)	40 (68,9%)	36 (62,1%)	58 (100%)
Negativo	0	1 (1,7%)	15 (25,9%)	22 (37,9%)	0
Insuficiente	0	0	3 (5,2%)	0	0
Total	58 (100%)	58 (100%)	58 (100%)	58 (100%)	58 (100%)

PCR1: “primer” de mini-exon; PCR 2: “primer” de kDNA.; IDRM: intradermoreação de Montenegro; IH: imunohistoquímica
p: NS

TABELA 6 - RESULTADOS DOS DIFERENTES MÉTODOS DIAGNÓSTICOS
REALIZADOS COM AMOSTRAS DE BIÓPSIAS FIXADAS EM
FORMOL, DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA
NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL – 1997 E 1998

Resultados	EXAME DIRETO	IDRM	PCR 1
Positivo	13 (100%)	12 (92,3%)	6 (46,2%)
Negativo	0	1 (7,7%)	7 (53,8%)
Total	13 (100%)	13 (100%)	13 (100%)

PCR 1: “primer” de mini-exon; IDRM: intradermorreação de Montenegro

5 DISCUSSÃO

No período que compreende janeiro 1997 a dezembro de 1998, o Estado do Espírito Santo notificou 1050 casos de leishmaniose tegumentar (FUNASA, 2002). Calcula-se que cerca de 90% destes casos sejam leishmaniose cutânea (Vigilância Ambiental da Secretaria da Saúde do Estado do Espírito Santo, 2003). Assim, o estudo por nós desenvolvido analisou 6,8% de todos os casos de leishmaniose tegumentar, e aproximadamente 7,5% dos casos de LC ocorridos no Estado do Espírito Santo nos anos de 1997 e 1998, constituindo-se de amostra representativa deste período. O maior número de amostras era procedente de pacientes do município de Viana (78,9%), fato que poderia ser explicado pela ocorrência de surto nesta região no ano de 1997, além de ser este um município que, juntamente com Cariacica, mantém níveis endêmicos da doença ao longo dos anos (Vigilância Ambiental da Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo, 2003).

Nesta série, LC acometeu indivíduos de todas as faixas etárias, de 8 a 73 anos, com idade média de 27,1 anos. Destes, 77,5% dos casos ocorreram em adultos com menos de 40 anos, fase economicamente produtiva da vida, podendo comprometer o desenvolvimento financeiro da região em casos de maior severidade. Embora tenha predominado entre o sexo masculino (69%), as mulheres também foram acometidas (31%). Este fato, associado à presença da doença em crianças

menores de 15 anos (29,6% de todos os casos), pode estar relacionado à transmissão peridomiciliar da leishmaniose na região, estando relacionado à construção das casas em áreas de encostas com plantações de bananas, ambientes bastante favoráveis à proliferação de flebotomíneos, além da presença de cães infectados que mantêm uma enzootia doméstica. (FALQUETO & SESSA, 1991). Dados epidemiológicos semelhantes foram reportados em estudo realizado na Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (PASSOS et al., 2001).

O diagnóstico de LC é feito habitualmente através da associação de dados clínicos e epidemiológicos a pelo menos um teste diagnóstico, preferencialmente aquele que identifique o agente etiológico. Embora não exista nenhum método diagnóstico que usado isoladamente seja seguro o suficiente para afastar a possibilidade de LC, a principal ferramenta para este fim é o exame parasitológico, tradicionalmente a pesquisa direta de amastigotas em esfregaço e aposição (REEED, 1996). Entretanto, seus resultados têm se mostrado variáveis em literatura, com positividade de 18,7% (WEIGLE et al., 1987) a 100% (NAVIN et al., 1990), dependendo de aspectos subjetivos, como a experiência do examinador, assim como do tempo de evolução da doença, forma de apresentação, quantidade de parasitas presentes na lesão avaliada e número de amostras avaliadas da mesma lesão.

Estudo colombiano com 165 pacientes com lesões sugestivas de LC comparando sete métodos diagnósticos encontrou 67% de sensibilidade total, com a combinação de todos os métodos (WEIGLE et al., 1987). Em uma série de 362 pacientes com LC, 70% tiveram diagnósticos confirmados. Pesquisa direta de amastigotas foi positiva em 57% dos casos e isolamento do agente variou de 27% a 83%, na dependência da quantidade de amastigotas visualizadas ao exame direto

(NAVIN et al., 1990). SILVEIRA, T.G.V. et al. (1999) reportaram 97,2% de positividade diagnóstica com a associação de exame parasitológico direto e IDRM, com resultados inferiores com uso das técnicas isoladamente, 95,1% em IDRM e 59,4% em exame direto. Em nossa casuística, não fizemos comparações entre os resultados obtidos com imunohistoquímica, IDRM e PCR com aqueles do exame microscópico direto, uma vez que a positividade deste último método foi considerada como critério fundamental para a inclusão das amostras no estudo.

Em vista da disparidade de resultados de exames clássicos empregados para confirmação diagnóstica de LC, faz-se necessária investigação de métodos sensíveis e específicos, e que sofram pouca interferência de fatores subjetivos. A PCR é um método diagnóstico com técnica e protocolos padronizados, utilizando programas que ajustam tempo, temperatura e número de ciclos empregados em sua realização. A análise dos produtos amplificados se processa por eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose, as quais também possuem técnica padronizada, usando marcador molecular de referência com “bandas” de pesos moleculares standardizados e previamente conhecidos.

Nós avaliamos a PCR no diagnóstico de LC utilizando duas metodologias diferentes, baseadas fundamentalmente na aplicação de “primers” com alvos de amplificação diferentes. Dois “primers” de mini-exon foram padronizados: um específico para gênero e outro específico para subgênero, com objetivo de capacitar confirmação diagnóstica e identificação do subgênero responsável pelos casos de LC na região estudada. Posteriormente, nossas amostras incluídas em parafina foram submetidas a PCR-RFLP, executada com “primer” de kDNA com os mesmos propósitos.

Ambos os “primers” de mini-exon foram desenhados com base em seqüências reportadas como eficientes (DEGRAVE, et al., 1994; FERNANDES et al., 1994; HARRIS et al., 1995), utilizando programas de domínio público, Primer 3 e Blast. Diversos experimentos, não demonstrados no conteúdo deste estudo a fim de torná-lo mais objetivo, foram realizados até que chegássemos às seqüências e protocolos empregados. Os “primers” foram exaustivamente testados em isolados de cultura de *Leishmania* e em espécime clínico com positividade confirmada, sob condições de laboratório padronizadas, com a colaboração de Dra Lucile M. Floeter-Winter (Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade São Paulo). Para PCR-RFLP utilizamos “primer” e técnica previamente testados e padronizados (VOLPINI et al., 2000).

A PCR de mini-exon foi positiva em 59,2% (42 de 71) do total de amostras testadas, 62,1% (36 de 58) em amostras incluídas em parafina, e 46,1% (6 de 13) em amostras fixadas em formol. Resultados falso-positivos ocorreram em 4,8% das amostras de controle. Todavia, a PCR com primer de kDNA se mostrou bastante eficiente em amplificar DNA extraído do material incluído em parafina, com positividade de 100% (58 de 58), traduzindo-se em método bastante sensível e com aplicabilidade no diagnóstico de LC, conforme previamente publicado por outros autores (RODGERS et al., 1990; BELLI et al., 1998; PASSOS et al., 1999).

Segundo DEGRAVE et al. (1994), “primers” de mini-exon utilizados para diagnóstico de gênero podem resultar em menor sensibilidade quando comparados a “primers” de kDNA, porém com melhor rendimento no diagnóstico específico para identificação de subgênero e espécie. Nossos resultados são coerentes com estas observações. Entretanto, o “primer” de mini-exon específico para subgênero

utilizado em nossos experimentos falhou em amplificar DNA de todas as amostras testadas, independente da técnica utilizada no processamento de estoque.

O tipo de teste diagnóstico usado como padrão ouro contribui para variabilidades na sensibilidade, podendo as diferenças de rendimento da PCR encontradas nos diferentes estudos serem atribuídas este critério (AVILES et al., 1999). Em nosso estudo, utilizamos a positividade da pesquisa direta de amastigotas para confirmar o diagnóstico de LC na seleção de nossas amostras, excluindo a possibilidade de trabalhando com tecidos de pacientes com outros diagnósticos, a fim de uniformizar e facilitar a análise de nossos resultados.

Fatores como o menor comprimento do “primer”, reduzindo a possibilidade da DNA polimerase falhar em completar a extensão (AVILES et al., 1999), e o percentual de pares de bases constituídos por guanina-citosina (DE BRUJIN & BARKER, 1992), dificultando o anelamento, foram considerados na escolha e padronização dos “primers” de mini-exon empregados em nosso estudo. Não podem, contudo, deixar de serem considerados como causas de resultados falsos negativos nas amostras estudadas.

Reiteramos a possibilidade de interferência de substâncias liberadas nos processos de estocagem do material biopsiado, assim como nos processos de extração dos tecidos dos mesmos. Resultados falso-negativos ocorridos em nossa casuística podem estar relacionados à presença de substâncias potencialmente inibitórias de amplificação não removidas durante o preparo das amostras (DE BRUJIN & BARKER, 1992; BELLI et al., 1998), tanto em formol como em parafina.

Substâncias como formol são quimicamente instáveis e não permitem a manutenção da integridade tecidual por muito tempo, sendo a mesma perdida progressivamente. Assim, com o tempo os espécimes mantidos em fixação podem sofrer danos estruturais que reduzam a probabilidade de detectarmos o agente etiológico mesmo utilizando PCR, fato que pode ter ocorrido com nossas amostras fixadas em formol. Por outro lado, amostras incluídas em parafina apresentam maior estabilidade e parecem manter sua integridade histológica pelo fato de estarem preservadas em meio seco e sólido. Não obstante, o DNA pode sofrer alterações irreversíveis quando está sendo extraído do tecido conservado, tanto em formol como em parafina, podendo inclusive ser perdido durante este processo. Adicionalmente, pode acontecer interferência de substâncias inibidoras durante as fases de anelamento e amplificação da PCR (AVILES et al., 1999). Excesso de DNA humano também é indesejável, produzindo padrões inapropriados, e comprometendo o êxito deste método (DE BRUJIN & BARKER, 1992).

Um outro fator que pode ter influenciar a qualidade da amostra e alterar o rendimento da reação é a presença de contaminação bacteriana e fúngica (DE BRUJIN & BARKER, 1992), uma variável muito difícil de ser controlada quando estamos trabalhando com espécimes clínicas estocadas, principalmente em um período longo de tempo. As amostras empregadas em nosso estudo foram mantidas em estoque por um período de 4 a 5 anos, podendo ter passado esta e por todas as alterações discutidas anteriormente.

Não obstante toda revisão a respeito das possíveis variáveis que possam ter prejudicado a sensibilidade de nossos experimentos, escolhemos trabalhar com estas amostras por existirem descrições de sucesso na realização de PCR com o uso de

formol (MIMORI et al., 1998; MIMORI et al., 2002; WEIGLE et al., 2002), e parafina (LASKAY et al., 1995; SCHUBACH et al., 1998; UEZATO et al., 1998), empregados no diagnóstico de leishmaniose.

As vantagens de se utilizar meios de preservação de espécimes consiste na facilidade de transporte de um local menos apropriado para outros mais bem equipados para realização de exames com certo grau de complexidade, tornando factível a precisão diagnóstica em casos que se sucedam em áreas endêmicas sob condições de campo.

A PCR com “primer” de mini-exon foi positiva em 46,1% (6 de 13) das amostras em formol e 62,1% (36 de 58) em amostras de parafina. A diferença de 16,0% na sensibilidade não tem relevância estatística uma vez que os dois grupos de amostras não são comparáveis devido às diferenças no tamanho das amostras (58 no grupo em parafina e 13 no grupo em formol). Inversamente aos nossos achados, WEIGLE et al. (2002) referiram positividade de 53% em material incluído em parafina e 75,7% em espécime incluído em formol, porém utilizando “primer” amplificando kDNA. Novos estudos com desenhos específicos para comparar estes métodos de estoque de amostras deverão ser conduzidos.

Embora tenhamos empregado rigorosamente todas as estratégias recomendadas no controle de resultados falso-positivos (DEGRAVE et al., 1994; BELLI et al., 1998), ocorreu um caso entre as 21 amostras (4,8%) de controles negativos utilizadas durante a realização da PCR com “primer” de mini-exon. Este fato suscita a possibilidade da interferência de fatores ainda não ponderados. Apesar de estarmos trabalhando com método descrito como altamente sensível, o que realmente aumenta a chance de resultados falso-positivos, a especificidade da PCR

tem sido reportada como 100% (BELLI et al., 1998), o que nos obriga à realização de posteriores avaliações de toda técnica adotada na realização de nossas reações, a fim de afastar possíveis causas para este resultado.

Análise imunohistoquímica das nossas amostras incluídas em parafina resultou em positividade de 72,2% (40 de 55). Este método tem sido utilizado com sucesso com o objetivo de melhorar a eficiência diagnóstica de estudos histológicos, apresentando positividade de 51% (KENNER et al., 1999) a 64,5% (SOTTO, et al., 1989) e chegando a aumentar a capacidade diagnóstica da histopatologia em até 40% (SOTTO, et al., 1989). Em nosso estudo a imunohistoquímica apresentou 27,8% (15 de 55) de resultados negativos em amostras que tinham diagnósticos confirmados por pesquisa direta de amastigotas utilizada como padrão ouro. Contudo, durante a fixação do tecido no preparo das lâminas a serem examinadas existe a possibilidade de ocorrer distorção de amastigotas, o que não acontece quando realizamos exame de esfregaço e aposição. Outrossim, imunohistoquímica foi realizada em cortes de tecido com 4 μ , o que possibilita diferenças no padrão do tecido avaliado por um método e outro.

Nós comparamos os resultados da PCR com “primer” de mini-exon com semiquantificação de parasitas à imunohistoquímica e encontramos positividade de 23,6% quando o parasitismo foi discreto e 5,4% quando intenso. Uma vez que antes da realização da imunohistoquímica e da PCR as amostras foram submetidas a cortes de 4 μ , existe a possibilidade de estarmos comparando fragmentos de tecido com diferentes quantidades de antígenos e parasitas, além da variabilidade da local da lesão que realmente estava sendo examinado de uma amostra para outra, o que justifica este resultado paradoxal. Cabe lembrar que à imunohistoquímica não foi

avaliada a quantidade de amastigotas por amostra estudada, mas a quantidade de antígenos detectados por anticorpo policlonal.

Ressaltamos que a PCR com ‘primer’ de mini-exon foi positiva em 18,2% das amostras com imunohistoquímica negativa e com “primer” de kDNA em 100% delas, mostrando eficiência da técnica independente da quantidade de parasitas avaliada pela detecção de antígenos na amostra, diferentemente do que tem sido descrito com a eficiência de métodos de cultivo quando relacionados ao parasitismo nas lesões (NAVIN et al., 1990).

Estes achados podem estar relacionados ao fato da PCR ser sensível o bastante para ser capaz de detectar DNA onde uma quantidade mínima está presente. Por este motivo, a PCR vem sendo inclusive suscitada como método de excelência no diagnóstico de lesões antigas, naquelas em que o diagnóstico é de grande suspeição, mas cujos resultados são negativos através de métodos diagnósticos clássicos, nos pacientes que iniciaram tratamento específico antes da coleta de material e em casos de recaídas ou recidivas de pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* (SCHUBACH et al., 1998; ROMERO et al., 2001).

Fica cada vez mais claro que a identificação da espécie do parasita é uma etapa importante do diagnóstico de LC, relacionada a diferenças na infectividade e patogenicidade do mesmo, interferindo na avaliação terapêutica e prognóstica (GRIMALDI & TESH, 1993; KOFF & ROSEN, 1994; SILVEIRA F.T. et al, 1998; ESCOBAR et al., 2002), e até mesmo nos métodos de controle da doença (GRIMALDI et al., 1987; GRIMALDI et al., 1989; GREVELINK & LERNER, 1996; SCHÖNIAN et al., 1996; BELLÍ et al., 1998; MEHREGAN et al., 1999; SALMAN et al., 1999).

PCR-RFLP amplificando kDNA foi a ferramenta utilizada em nosso estudo com a finalidade de proceder diagnóstico específico do agente etiológico de nossa casuística. Este método possibilitou a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida na etiologia de LC em todas as amostras avaliadas, sendo 100% das mesmas positivas para *Leishmania (V.) braziliensis*. Outros autores tem aplicado a associação da PCR com RFLP com sucesso na identificação de espécies de *Leishmania* tanto com digestão de produtos amplificados por “primers” de kDNA (VOLPINI, 2000), quanto de mini-exon (MARFURT et al., 2003) e gene de gp63 (VICTOIR et al., 2003)

Estudo realizado com anticorpos monoclonais (GRIMALDI et al., 1987) identificou a *L. (V.) braziliensis* como a espécie mais encontrada em nosso país, principalmente no Nordeste e Sudeste. No Espírito Santo, a *L. (V.) braziliensis* também tem sido descrita como espécie predominante em estudos utilizando inoculação em “hamster” (BARROS et al., 1985; FALQUETO et al., 1986); análise de zimodemas (BRAHIM, 1999) e anticorpos monoclonais (GRIMALDI et al., 1987), em concordância com nossos achados.

PCR tem sido empregada em outros estudos brasileiros na identificação da espécie de *Leishmania* responsável por casos de LTA. Em Minas Gerais PASSOS et al.(1999) encontraram 92,5% de *Leishmania (V.) braziliensis* e 7,5% de *Leishmania (L.) amazonensis*, no diagnóstico de 53 pacientes com LC. No Rio de Janeiro *Leishmania (V.) braziliensis* também tem sido descrita como a espécie predominante, tendo sido detectada em 100% dos casos em casuística de 134 pacientes com LTA (PIRMEZ et al., 1999).

Conforme considerações apontadas, PCR tem sido utilizada para detectar *Leishmania* em lesões cutâneas com sucesso e constantes modificações na sua técnica têm sido realizadas na tentativa de otimizar e consagrar seu uso no diagnóstico de LC, proporcionando, além de maior sensibilidade e especificidade, condições de aplicabilidade em áreas endêmicas.

Esforços têm sido despendidos na avaliação de métodos práticos que permitam manutenção dos caracteres da amostra, assim como maior facilidade no estoque de tecidos biopsiados que serão processados por PCR (ANDRADE et al., 2001; MARQUES et al., 2001; MIMORI et al., 2002), solucionando o problema da distância entre o local aonde a LTA ocorre e aquele aonde o exame será processado, e ainda tornando possível análises epidemiológicas posteriores relacionadas ao agente etiológico da doença.

Ainda parece ser necessário o estabelecimento de padronizações metodológicas a fim de que os resultados ora publicados sejam reprodutíveis em quaisquer laboratórios com controle de qualidade, a fim de que sua aplicabilidade se torne universal. Assim que alcançarmos esta realidade, a PCR poderá ser avaliada como método padrão na confirmação diagnóstica e identificação etiológica da leishmaniose cutânea.

Nossos resultados nos permitem concluir que a leishmaniose cutânea no Estado do Espírito Santo está relacionada predominantemente à *Leishmania (V.) braziliensis*, o que demanda um controle ambulatorial rigoroso dos pacientes subsequente ao tratamento, pelo risco do aparecimento de lesões mucosas futuras. Este fato reforça a importância do diagnóstico etiológico específico de pacientes com

leishmaniose cutânea tanto no Estado Espírito Santo, como em outras regiões endêmicas para esta doença.

VI CONCLUSÕES

1. PCR utilizando “primer” amplificando gen de mini-exon específico para o gênero *Leishmania* foi capaz de diagnosticar leishmaniose cutânea em 59,2% do total de amostras estudadas, falhando em estabelecer o diagnóstico espécie-específico com o “primer” testado.
2. A PCR utilizando “primer” amplificando kDNA mostrou-se altamente eficiente em diagnosticar leishmaniose cutânea, com positividade de 100% nas amostras incluídas em parafina, independente da semiquantificação do parasitismo das mesmas avaliado à imunohistoquímica.
3. A PCR-RFLP foi capaz de diagnosticar a espécie de *Leishmania* em todas as amostras na qual foi empregada, identificando a *Leishmania (V.) braziliensis* em 100% das mesmas.
4. A técnica de PCR tendo como alvo o kDNA se mostrou eficiente no diagnóstico de leishmaniose cutânea em amostras incluídas em parafina obtidas através de biópsias de lesões de pacientes do Estado do Espírito Santo, Brasil. Associada à RFLP representa ferramenta diagnóstica de grande importância na determinação

da espécie de *Leishmania* responsável pelos casos de leishmaniose cutânea no Espírito Santo e em outras regiões onde esta doença é endêmica.

ANEXO A

Figura 8: Seleção das amostras segundo critérios de inclusão e exclusão

ANEXO B

FORMULÁRIO PARA COLETA E ARMAZENAGEM DE DADOS

Número do formulário:			
Nome:			
Endereço			Município
Sexo F ( ) M ( )		Idade	
Dados clínicos			
Presença de lesão cutânea ( ) S ( ) N Número de lesões ( )	Tipo de lesão	Tamanho	Localização
	1 _____	_____	_____
	2 _____	_____	_____
	3 _____	_____	_____
	4 _____	_____	_____
	5 _____	_____	_____
	6 _____	_____	_____
Cicatriz de lesão antiga ( ) S ( ) N	Tratamento: S ( ) N ( ) Caso positivo, resposta terapêutica: : S ( ) N ( )		
Intradermorreação Data da aplicação (/ /) data da leitura (/ /) Resultado: Positivo ( ) Negativo ( )			
Esfregaço Positivo ( ) Negativo ( )			
Imunohistoquímica Positiva: S ( ) N ( )			
Parasitismo: Discreto ( ) Moderado ( ) Intenso ( )			
PCR Gênero: Mini-exon: positivo ( ) negativo ( ) kDNA: positivo ( ) negativo ( ) Determinação de espécie: S ( ) N ( ) Espécie:			

ANEXO D

Figura 10: Análise do amplificado da PCR com “primer” de mini-exon específico para gênero *Leishmania*, em gel de poliacrilamida, realizado durante fase de teste e padronização

ANEXO E

Figura 11: Análise dos amplificados da PCR de mini-exon específico para subgênero *viannia*, em gel de poliacrilamida 6%, realizado durante teste e padronização

1: PM; 2: amostra de tecido ICB; 3: cultura *L. braziliensis* IMT;
4: cultura *L. braziliensis* ICB (Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade São Paulo, São Paulo, Brasil)

ANEXO F

Figura 12: Análise dos amplificados da PCR com “primer” de mini-exon específico para gênero *Leishmania*, de amostras fixadas em formol, em gel de poliacrilamida 6%

NOTA: LNP: amostras em formol

1: PM ; 2: LNP 22; 3: LNP23; 4:LNP24; 5: LNP25; 6: LNP26;
7: LNP27; 8: LNP28; 9: LNP29; 10: LNP30; 11: controle positivo;
12: controle negativo; 13: controle positivo; 14:branco

ANEXO G

Figura 13: Lâminas de imunohistoquímicas positivas de amostras de biópsias incluídas em parafina de pacientes com leishmaniose cutânea, Espírito Santo, 1997

ANEXO H

Figura 14: Análise dos amplificados da PCR com “primer” de mini-exon específico para gênero *Leishmania*, de amostras incluídas em parafina, em gel de poliacrilamida 6%

NOTA: LP: amostras em parafina

1: PM ; 2: cultura *L amazonensis* IMT; 3: cultura *L braziliensis* IMT;
4: cultura *L chagasi* IMT; 5: LP1; 6: LP2; 7: LP3; 8: LP4; 9: LP5;
10: controle negativo.

ANEXO I

Figura 15: Análise dos amplificados da PCR com “primer” de kDNA específico para gênero *Leishmania*, de amostras incluídas em parafina, em gel de poliacrilamida 6%

1: Marcador Molecular; 2: Controle +: *L. (L.) amazonensis*;
3: Controle +: *L. (V.) braziliensis*; 4 até 15: amostras do ES

ANEXO J

Figura 16: Análise dos produtos da PCR-RFLP com a enzima Hae III, específica para espécie *Leishmania (V.) braziliensis*, de amostras incluídas em parafina, em gel de poliacrilamida 10%

1: P M; 2: Controle +: *Leishmania (L.) amazonensis*;
 3: Controle +: *Leishmania (V.) braziliensis*;
 4 até 15: amostras do ES

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMATO, V.S.; DE PAULA, J.G.; BOULOS, M.I.C.; NICODEMO, E.L.; BOULOS, M., AMATO NETO, V. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Bras. Méd.**, v.53, p.202-14, 1996.
- AMATO, V.S.; DUARTE, M.I.R.; NICODEMO, A.C.; CARVALHO, L.V.; PAGLIARI, C.; MATTA, V.L.R.; OLIVEIRA, L.S.; CASTRO, S.M.; UIP, D.E.; AMATO, J.G.P.; AMATO NETO, V. An evaluation of clinical, serological, anatopathological and immunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. **Rev. Inst. Med., Trop. São Paulo.**, v.40, p.23-30, 1998.
- ANDRADE, A.S.R.; GOMES, R.F.; FERNANDES, O.; MELO, M.N. Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**, v.78, p.261-7, 2001.
- ANDRADE, L.E.C. Princípios de biologia molecular e suas aplicações em medicina. **Rev. Ass. Méd. Brasil.**, v.39, p.175-86, 1993.
- AREVALO, I.; WARD, B.; MILLER, R.; MENG, T.; NAJAR, E.; ALVAREZ, E.; MATLASHEWSKI, G.; LLANOS-CUENTAS, A. Successful treatment of drug-resistence cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. **Clin. Infec. Dis.**, v.33, p.1847-51, 2001.

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin. Dermatol.**, v.14, p.523-32, 1996.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v.30, p.1269-81, 2000.

AVILES, H.; BELLI, A.; ARMIJOS, R.; MONROY, F.P.; HARRIS, E. PCR Detection and identification of *leishmania* parasite in clinical specimens in ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. **J. Parasitol.**, v.85, p.181-7, 1999.

AZEREDO-COUTINHO, R.B.G.; MENDONÇA, S.C.F. An intermittent schedule is better than continuous regimen of antimonial therapy for cutaneous leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.35, p.477-81, 2002.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI, G. Jr.; MOMEM, H.; McMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON Jr., W.D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produce a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.44, p. 536-46, 1991.

BARRAL, A.; COSTA, J.M.D.; BITTENCOURT, A.L.; BARRAL-NETO, M.; CARVALHO, E.M. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in brazil: clinical and immunopathologic aspects. **Int. J. Dermatol.**, v.34, p.474-9, 1995.

BARROS, G.C. SESSA, P.A.; MATTOS, E.A.; CARIAS, V.R.D.; MAYRINK, W.; ALENCAR, J.T.A.; FALQUETO, A; DE JESUS, A.C. Foco de leishmaniose

- tegumentar americana nos municípios de Viana e Cariacica, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Rev. Saúde Públ. São. Paulo**, v.19, p.146-53, 1985.
- BELLI, A.; RODRIGUES, B.; AVILES, H.; HARRIS, E. Simplified polymerase chain reaction detection of New World *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.58, p.102-9, 1998.
- BERMAN, J.D. Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v.14, p.519-22, 1996.
- BERMAN, J.D. Leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infect. Dis.**, v.24, p.684-703, 1997.
- BHATTACHARYYA, R.; DAS, K.; SEN, S.; ROY, S.; MAJUMDER, H.K. Development of a genus specific primer set for detection of *Leishmania* parasites by polymerase chain reaction. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.135, p.195-200, 1996.
- BITTENCOURT, A.L.; BARRAL, A. evaluation of the histopathological classification of american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v.86, p.51-6, 1991.
- BITTENCOURT, A.L.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.L.; SALDANHA, A.C.; BADARÓ, F.; BARRAL-NETTO, M.; FREITAS, L.A.R. diffuse cutaneous leishmaniasis with atypical aspects. **Int. Soc. Dermatol.**, v.31, p.568-70, 1992.
- BITTENCOURT, A.; BARRAL, A. & COSTA, J.M.L. Tegumentary leishmaniasis in childhood. **Ped. Dermatol.**, v.13, p.455-63, 1996.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Evasion strategies of *Leishmania* parasite. **Parasitol. Today**, v.6, p.183-7, 1990.

BOTELHO, A.C.C.; TAFURI, W.L.; GENARO, O.; MATRINK, W.

Histopathology of human american cutaneous leishmaniasis before and after treatment. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.31, p.11-8, 1998.

BRAHIM, L.R.N. **Heterogeneidade genética de *Leishmania (Viannia)***

***braziliensis* e suas implicações epidemiológicas na região Sudeste do Brasil.**

Rio de Janeiro, 1999. 69p. Dissertação de Mestrado - Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

BRENIÈRE, S.F.; TELLERIA, J.; BOSSENO, M.F.; BUITRAGO, R.;

BASTRENTA, B.; CUNY, G.; BANALUS, A.L.; BREWESTER, S.; BARKER, D.C. Polymerase chain reaction-based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes. **Acta Tropica**, v.73, p.283-93, 1999.

BRYCESON, A.D.M. Leishmaniasis. In: COOK, G.C.. **Manson's Tropical**

Diseases. 20.ed. Ed. WB Saunders Company Ltda, 1996, cap.65, p.1213-38.

CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.L.; BITTENCOURT, A.;

MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica**, v.56, p.315-25, 1994.

CASTRO, R.M. Tratamento da leishmaniose tegumentar pela anfotericina b – a propósito de 70 casos. **An. Bras. Dermat.**, v.47, p.229-33, 1972.

CONVIT, J. Leishmaniasis: Immunological an Clinical Aspects and Vaccines in Venezuela. **Clin. Dermatol.**, v.14, p.479-87, 1996.

CRUZ, A.K. & TOSI, L.R.O. Molecular biology. **Clin. Dermatol.**, v.14, p.533-40, 1996.

- DABIRI, S.; MEYMANDI, S.S.; HAYES, M.M.; SOLEIMANI, F.; KHARAZMI, A. Intralesional autotherapy of cutaneous leishmaniasis with buffy coat cells: cytological findings. **Acta Tropica**, v.75, p.1-7, 2000.
- DA CRUZ, A. M. & AZEREDO COUTINHO, K.B. Leishmaniose tegumentar americana. In: BATISTA, R.S.; GOMES, A.P.; IGREJA, R.P.; HUGGINS, R..P. **Medicina tropical, abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias**. 1.ed. Ed. Cultura Médica, 2001, v.I, cap.15, p.131-40.
- DAVIES, C.R.; KAYE, P.; CROFT, S.L.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **BMJ.**, v.326, p.377-82, 2003.
- DE BRUIJN, M.H.L. & BARKER, D.C. Diagnosis of New world leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, v.52, p.45-58, 1992.
- DE BRUIJN, 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. **Trop. Med. Parasitol.**, v.44, p.201-7, 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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v.89, p.463-9, 1994.
- DEPS, P.D. **Estudo Comparativo entre o antimonio de N. Metilglucamina e o Estibogluconato de Sódio BP88® no Tratamento da Leishmaniose Cutânea Localizada**. Espírito Santo, 1998. 102p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Espírito Santo.

- DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clin. Dermatol.**, v.14, p.417-23, 1996.
- DOGRA, J. & SAXENA, V.N. Itraconazole and leishmaniasis: a randomised double-blind trial in cutaneous disease. **Int. J. Parasitol.**, v.26, p. 1413-5, 1996.
- DOWLATI, Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. **Clin. Dermatol.**, v.14, p.425-31, 1996.
- DOWLATI, Y.; EHSASI, S.; SHIDANI, B.; BAHAR, K. Stepwise safety trial of a killed *leishmania* vaccine in Iran. **Clin. Dermatol.**, v.14, p.497-502, 1996.
- ESCOBAR, P.; MATU, S.; MARQUES, C.; CROFT, S.L. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Tropica**, v.81, p. 151-7, 2002.
- FALQUETO, A.; COURA, J.R.; BARROS, G.C.; GRIMALDI, G.; SESSA, P.A.; CARIAS, V.R.D.; DE JESUS, A.C.; ALENCAR, J.T.A. A. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.81, p.155-63, 1986.
- FALQUETO, A. & SESSA, P. A. Leishmaniose Tegumentar Americana In: VERONESI, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8 ed. Rio de Janeiro, Ed.Guanabara Koogan S. A., 1991. Cap.89, p.750-62.
- FALQUETO, A.; SESSA, P.A.; VAREJÃO, J.B.M.; BARROS, G.C.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo State, Brazil, further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v.86, p.499-500, 1991.

FALQUETO, A; SESSA, P.A. & VAREJÃO, J.B.M. Eco-epidemiologic aspects of muco-cutaneous leishmaniasis in Espírito Santo: evidence of domiciliary transmission and the role of domestic animals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, supp. especial, p.59-66, 1993.

FALQUETO, A. **Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no Estado do Espírito Santo, Brasil.** Rio de Janeiro, 1995. Tese de Doutorado - Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

FERNANDES, O; MUTHY, K.V.; KURATH, U.; DEGRAVE, W.M.; CAMPBELL, D.A.; Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.66, p.261-71, 1994.

FESTA NETO, N.; SOTTO, M.N. & CUCE, C. Intradermorreação de Montenegro: aspectos histopatológicos e imunológicos. **Méd. Cut. Ibero Lat. Amer.**, v.19, p.293-301, 1991.

FLOETER-WINTER, L. & ULIANA, S.R.B. Molecular biology applied to parasitology: The ribosomal cistron as a tool in taxonomic and phylogenetic studies and as model for gene expression analysis. **Mol. Biol. Brazil**, v.45, p.210-5, 1993.

FUNASA, 2002. Website: http://www.funasa.gov.br/epi/pdfs/situação_doenças.pdf

GADELHA, A.R.; OLIVEIRA, W.C.; ASSUNÇÃO, I.J.; DOURADO, H.V. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana com injeções intralesionais de n-metil-glucamina. **An. Bras. Dermat.**, v.65, p.201-3, 1990.

- GENARO, O.; DE TOLEDO, V.P.C.P.; DA COSTA, C.A.; HERMETO, M.V.;
AFONSO, L.C.C.; MAYRINK, W. Vaccine for prophylaxis and
immunotherapy, Brazil. **Clin. Dermatol.**, v.14, p.503-12, 1996.
- GREVELINK, S.A. & LERNER, E.A. Leishmaniasis. **J. Am. Acad. Dermatol.**,
v.34, p.257-72, 1996.
- GRIMALDI, G.Jr.; DAVID, J.R. & McMAHON-PRATT, D. Identification and
distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis
using monoclonal antibodies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.36, p.270-87, 1987.
- GRIMALDI, G.Jr.; TESH, R.B. & McMAHON-PRATT, D. A Review of the
geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World.
Am. J. Trop. Med. Hyg., v.41, p.687-725, 1989.
- GRIMALDI, G.Jr. & TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current
concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.6, p.230-
50, 1993.
- GRISARD, E.C.; E.C.; STEINDEL, M.; SHAW, J.J.; ISHIKAWA, E.A.Y.;
CARVALHO-PINTO, C.J.; EGER-MANGRICH, I.; TOMA, H.K.; LIMA, J.H.;
ROMANHA, A.J.; CAMPBELL, D.A. Characterization of *Leishmania* sp.
strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in
Santa Catarina, southern Brazil. **Acta Tropica**, v.74, p.89-93, 2000.
- GUEVARA, P.; ALONSO, G.; DA SILVEIRA, J.F.; MELLO, M.; SCORZA, J.V.;
AÑEZ, N.; RAMÍREZ, J.L. Identification of New World *Leishmania* using
ribosomal gene spacer probes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.56, p.15-26, 1992.
- GUTIERREZ, Y.; SALINAS, G.H.; PALMA, G.; VALDERRAMA, L.B.;
SANTRICH, C.V.; SARAIVA, N.G. Correlation between histopathology,

- immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. **Am J Trop Med Hyg.**, v.45, p.281-9, 1991.
- HARRIS, E.; KROPP, G.; BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AGABIAN, N. Single-step multiplex pcr for characterization of New World *Leishmania* complexes. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p.1989-95, 1998.
- HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, v.354, p.1191-9, 1999.
- HIRATA, M.H. & HIRATA, R.D.C. Aplicação da pcr em laboratório clínico e medicina forense. In: CURSO DE ATUALIZAÇÃO, São Paulo, 1981. São Paulo, Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciência Farmacêuticas da Universidade São Paulo, 1997. p.28-37. [Apostila]
- HOMMEL, M.; JAFFE, C.L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.89, p.55-73, 1995.
- KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.21, p.123-52, 1995.
- KENNER, J.R.; ARONSON, N.E.; BRATTHAUER, G.L.; TURNICKY, R.P.; JACKSON, J.E.; TANG, D.B.; SAU, P. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. **J. Cutan. Pathol.**, v.26, p.130-6, 1999.
- KHARAZMI, A.; KEMP, K.; ISMAIL, A.; GASIM, S.; GAAFAR, A.; KURTZHALS, J.A.L.; EL HASSAN, A.M.; THEANDER, T.G.; KEMP, M. T-cell response in human leishmaniasis. **Immunol. Letters**, v.65, p.105-8, 1999.
- KLAUS, S.N.; FRANKENBURG, S.; INGBER, A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v.17, p.256-60, 1999.

KOFF, A. B. & ROSEN, T. Treatment of cutaneous leishmaniasis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.3, p. 693-708, 1994.

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

LASKAY, T; MIKO, T.L.; NEGESSE, Y.; SOLBACH, W.; ROLLINGHOFF, M; FROMMEL, D. Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.89, p.273-5, 1995.

LIMA, H.C.; VASCONCELOS, A.W.; DAVID, J.R.; LERNER, E.A. American cutaneous leishmaniasis: in situ characterization of the cellular immune response with time. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.50, p.743-7, 1994.

MACEDO, A.M.; MELO, M.N.; GOMES, R.F.; PENA, S.D.J. DNA fingerprints: a tool for identification and determination of the relationships between species and strains of *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.53, p.63-70, 1992.

MACHADO, P. et. al. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. **Clin. Infect. Dis.**, v.34, p.69-73, 2002 apud BARRAL et al., 1992.

MAGALHÃES, A.V.; MORAES, M.A.P.; RAICK, A.N.; LLANOS-CUENTAS, A.; COSTA, J.M.L.; CUBA, C.C.; MARSDEN, P.D. Histopatologia da Leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*: 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, v.28, p.253-62,. 1986.

- MARFURT, J.; NASEREDDIN, A.; NIEDERWIESER, I; JAFFE, C.L; BECK, H.P., FELGER, I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the mini-exon sequence and subsequent restriction fragment length polymorfism analysis. **J. Clin. Microbiol**, v.41, p.3147-53, 2003.
- 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 via polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.65, p.902-6, 2001.
- MARSDEN, P.D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.18, p.187-98, 1985.
- MARZOCHI, M.C.A; SCHUBACH, A.O.; MARZOCHI, K.B.F. Leishmaniose tegumentar americana. In: CIMERMAN, B & CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais**. Ed. Atheneu, cap. 9, p.39-64, 1999.
- MAYRINK, W.; MELO, M.N.; DA COSTA, C.A.; MAGALHAES, P.A ; DIAS, M.; COELHO, M.V.; ARAUJO, F.G.; WILLIAMS, P.; FIGUEIREDO, Y.P.; BATISTA, S.M. Intradermoreação e Montenegro na leishmaniose tegumentar americana após terapêutica antimonial. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.18, p.182-5. 1976.
- MAYRINK, W.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; WILLIAMS, P.; NASCIMENTO, E.; MAGALHÃES, P.A.; COSTA, C.A.A.; LIMA, A.O.; DIAS, M. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana utilizando vacina. **An. Bras. Dermat.**, v.66, p.55-9, 1991.

- MCSORLEY, S.; PROUDFOOT, L.; O'DONNELL, A.C.; LIEW, F. Immunology of murine Leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v.14, p.451-64, 1996.
- MEHREGAN, D.R.; MEHREGAN, A.H.; MEHREGAN, D.A. Histological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v.17, p.297-304, 1999.
- MIMORI, T.; SASAKI, J.; NAKATA, M.; GOMEZ, E.A.; UEZATO, H.; NONAKA, S.; HASHIGUCHI, Y.; FURUYA, M.; SAYA, H. Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. **Gene**, v.210, p.179-86, 1998.
- MIMORI, T.; MATSUMOTO, T.; CALVOPIÑA, M.H.; GOMEZ, E.A.; SAYA, H.; KATAKURA, K.; NONAKA, S.; SHAMSUZZAMAN, S.M.; HASHIGUCHI, Y. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. **Acta Tropica**, v.81, p.197-202, 2002.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL. Gerência Técnica De Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. Coordenação de Vigilância Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiologia. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana..5. Ed.** Brasília, Acessoria de Comunicação e Educação em Saúde – NED/ASCOM/FUNASA, 2000. 62p.
- MODABBER, F. Vaccines against leishmaniasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.89, p.83-8, 1995.
- MORIEARTY, P.L.; BITTENCOURT, A.L.; PEREIRA, C.; TEIXEIRA, R.; BARRETO, E.; GUIMARÃES, A. Boderline cutaneous leishmaniasis: clinical, immunological and histological differences from mucocutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v.20, p.15-21, 1978.

- MOSKOWITZ, P.F. & KURBAN, A.K. Treatment of cutaneous leishmaniasis: retrospective and advances for the 21st century. **Clin. Dermatol.**, v.17, p.305-15, 1997.
- NASCIMENTO, E.; MAYRINK, W.; DA COSTA, C.A.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; BARROS, G.C.; DIAS, M.; ANTUNES, C.M.F.; LIMA, M.S.; TABOADA, D.C.; LIU, T.Y. Vaccination of humans against cutaneous leishmaniasis: cellular and humoral immune response. **Infect. Immun.**, v.58, p.2198-203, 1990.
- NAVIN, T.R.; ARANA, F.E.; DE MÉRIDA, A.M.; ARANA, B.A.; CASTILLO, A.L.; SILVERS, D.N. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. **Am. J. Trop. Med Hyg.**, v.42, p.36-42, 1990.
- NOYES, H.A.; BELLI, A.A.; MAINGON, R. Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. **Am. J. Trop. Med Hyg.**, v.55, p.98-105, 1996.
- OLIVEIRA-NETO, M.; SCHUBACH, A.; MATTOS, M. A low-dose antimony treatment in 159 patients with american cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.57, p.651-5, 1997.
- OLIVEIRA-NETO, M.P.; MATTOS, M.; SOUZA, C.S.F.; FERNANDES, O; PIRMEZ, C. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Dermatol.** v.37, n.11, p.846-9, 1998.
- PAPADOPOULPOU, G.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. ISCOMs vaccine against experimental leishmaniasis. **Vaccine**, v.16, p.885-92, 1998.

- PASSOS, V.M.A.; ANDRADE, A.C.; SILVA, E.S.; FIGUEIREDO, E.M.;
FALCÃO, A.L. Inquérito canino em foco recente de leishmaniose tegumentar no município de Sabará, região metropolitana de Belo Horizonte. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.29, p.323-9, 1996.
- PASSOS, V.M.A.; VOLPINI, A.C.; BRAGA, E.M.; LACERDA, P.A.F.; OUAISSI, A.; LIMA-MARTINS, M.V.C.; KRETTLI, A.U. Differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. Using ELISA with a recombinant antigen (rTc24). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.**, v.92, p.791-3, 1997.
- PASSOS, V.M.A.; FERNANDES, O.; LACERDA, P.A.F.; VOLPINI, A.C.; GONTIJO, C.M.F.; ROMANHA, A.J. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with american cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. **Acta Tropica**, v.72, p.251-8, 1999.
- PASSOS, V.M.; BARRETO, S.M.; ROMANHA, A.J.; KRETTLI, A.U.; VOLPINI, A.C.; GONTIJO, C.M.; FALCAO, A.L.; LIMA-COSTA, M.F.F. Cutaneous leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte: clinical, laboratorial, therapeutic and prognosis features (1989-1995). **Rev. Soc. Bras. Med Trop** , v.34, p.5-12, 2001.
- PEARSON, D.P.; SOUZA, A.Q.; JERONIMO, S.M.B. *Leishmania* Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous, and mucosal leishmaniasis. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E. & DULIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. 5.ed. New York, Churchill Livingstone, 2000. Parte III, v.2, cap.265, p.2831-44.

- PIÑERO, J.; MARTINEZ, E.; PACHECO, R.; ARAGÓN, Z.; DE ARMAS, F.; DEL CASTILHO, A.; VALLADARES, B. PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.73, p.21-9, 1999.
- PIRMEZ, C.; TRAJANO, V.S.; PAES-OLIVEIRA NETO, M.; DA CRUZ, A.M.; GONÇALVES-DA-COSTA, C.; CATANHO, M.; DEGRAVE, W.; FERNANDES, O. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brasil. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p.1819-23, 1999.
- QIAO, Z.; MILES, M.A.; WILSON, S.M. Detection of parasites of the *Leishmania donovani*-complex by a polymerase chain reaction solution hybridization enzyme-linked immuno assay. **Parasitology**, v.110, p.269-75, 1995.
- RAMIREZ, J.R.; AGUDELO, S.; MUSKUS, C.; ALZATE, J.F.; BERBERICH, C.; BARKER, D.; VELEZ, I.D. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia; the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.3768-73, 2000.
- RAMOS-E-SILVA, M. & JACQUES, C.M.C. Leishmaniasis and other dermatozoonoses in Brazil. **Clin. Dermatol.**, v.20, p.122-34, 2002.
- RASO, P & GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 6^{ed}. Guanabara Koogan, 2000. Cap.33, p.1207-14.
- REED, S.G. Diagnosis of Leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v.14, p.471-8, 1996.
- REITHINGER, R. & DAVIES, C.R. Is the domestic dog (*Canis Familiaris*) a reservoir host of american cutaneous leishmaniasis? a critical review of the current evidence. **Am. J. Med. Hyg.**, v.61, p.530-41, 1999.

RIBEIRO, A.L.P.; DRUMMOND, J.B.; VOLPINI, A.C.; ANDRADE, A.C.;

PASSOS, V.M.A. Eletrocardiographic changes during low-dose, short-term therapy of cutaneous leishmaniasis with the pentavalent antimonial meglumine.

Braz. J. Med. Biol. Res., v.32, p.297-301, 1999.

RIDLEY, D.S.; MAGALHÃES, A.V. & MARSDEN, P.D. Histological analysis and the pathogenesis of mucocutaneous leishmaniasis. **J. Pathol.**, v.159, p.293-9, 1989.

RITTIG, M.G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitol. Today**, v.16, p.292-7, 2000.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WITTH, D.F. Amplification of kinetoplast as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp. Parasitol.**, v.71, p.267-75, 1990.

RODRIGUES, E.H.G. **Validação de abordagens moleculares para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco**. Recife, 2000. 168p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, Pernambuco.

RODRIGUES, M.L.O.; COSTA, R.S.; SOUZA, C.S.; FOSS, N.T.; ROSELINO, A.M.F. Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.41, p.33-7, 1999.

RODRIGUEZ N.; DE LIMA, H.; RODRIGUEZ, A.; BREWSTER, S.; BARKER, D.C. Genomic DNA repeat from *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Venezuelan strain) containing simple repeats and microsatellites. **Parasitology**, v.115, p.349-58, 1997.

- RODRIGUEZ N.; AGUILAR, C.M.; BARRIOS M.A.; BARKER, D.C. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.93, p.47-9, 1999.
- ROMERO, G.A.S., SAMPAIO, R.N.R.; MACEDO, V.O.M.; MARSDEN, P.D. Sensitivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis, in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v.9, p.505-8, 1999.
- ROMERO, G.A.S.; GUERRA, M.V.F.; PAES, M.G.; CUPOLILLO, E.; TOALDO, C.B.; MACEDO, V.M.; FERNANDES, O. Sensitivity of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. **Acta Tropica**, v.79, p.225-9, 2001.
- ROMERO, G.A.; ISHIKAWA, E.; CUPOLILLO, E.; TOALDO, C.B.; GUERRA, M.V.; PAES, M.G.; MACEDO, V.D.E.O.; SHAW, J.J. Identification of antigenically distinct populations of *Leishmania (Viannia) guyanensis* from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. **Acta Tropica**, v. 82, p. 25-9, 2002.
- RUSSELL, R.; IRIBAR, M.P.; LAMBSON, B.; BREWSTEER, S.; BLACKWELL, J.M.; DYE, C.; AJIOKA, J.W. Intra and Inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. **Mol Biochem Parasitol.**, v.103, p.71-7, 1999.
- SALIBA, E.K. & OUMEISH, O.Y. Reservoir host of cutaneous leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v.17, p.275-7, 1999.

- SALMAN, S.M.; RUBEIZ, N.; KIBBI, A. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. **Clin. Dermatol.**, v.17, p.291-6, 1999.
- SAMADY, J.A.; JANNIGER, C.K. & SCHWARTZ, R.A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cutis**, v.57, p.13-20, 1996.
- SAMPAIO, R.N.R.; MARSDEN, P.D.; LLANOS-CUENTAS, E.A. Leishmania mexicana amazonensis isolated from a patient with fatal mucosal leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.18, p.273-4, 1985.
- SAMPAIO, R.N.R.; SOARES, S.K.P.; ROSA, A.C.; NETTO, E.M.; MAGALHÃES, A.V.; MARSDEN, P.D. Tratamento com pentamidina de seis casos da forma mucosa de leishmaniose tegumentar. *An. Bras. Dermat.* v.63, p.439-42, 1988.
- SAMPAIO, R.N.R. & MARSDEN, P.D. Mucosal Leishmaniasis unresponsive to glucantime therapy successfully treated with AmBisome. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** v.91, p.77, 1997.
- SCHONIAN, G.; SCHWEYNOCH, C.; ZLATEVA, K.; OSKAM, L.; KROON, N.; GRASER, Y.; PRESBER, W. Identification and determination of the relationships of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 77, p.19-29, 1996.
- SCHUBACH, A.; HADDAD, F.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; DEGRAVE, W.; PIRMEZ, C.; GRIMALDI, G.Jr.; FERNANDES, O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **J. Infect. Dis.**, v.178, p.911-4, 1998.

- SCOTT, P. T-cell subsets and T-Cell antigens in protective immunity against experimental leishmaniasis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.155, p.35-52, 1990.
- SESSA, PA.; BARROS, G.C.; MATTOS, E.^a; CARIAS, V.R.D.; ALENCAR, J.T.A.; DELMAESTRO, D.; COELHO, A.C.C.; FALQUETO, A. distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Espírito Santo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropical**, v.18, p.237-41, 1985.
- SESSA, P.A.; FALQUETO, A.; BARROS, G.C.; VAREJÃO, J.B.M. Resultados da Reação de Montenegro em pacientes com leishmaniose tegumentar americana, autóctones do Estado do Espírito Santo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v.37, p.115-8, 1991.
- SESSA, A.P.; FALQUETO, A. & VAREJÃO, J.B.M. Tentativa de controle da leishmaniose tegumentar americana por meio do tratamento dos cães doentes. **Cad Saúde Públ.**, v.10, p.457-63, 1994.
- SILVEIRA, F.T.; BLACKWELL, J.M.; ISHIKAWA, E.A.; BRAGA, R.; SHAW, J.J.; QUINNELL, R.J.; SOONG, L.; KIMA, P.; McMAHON-PRATT, D.; BLACK, G.F.; SHAW, M.A. T cell response to crude and defined leishmanial antigens in patients from the Lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. **Parasite Immunol.**, v.20, p.19-26, 1998.
- SILVEIRA, F.T.; ISHIKAWA, E.A.Y. & LOPES, A.P. Avaliação da Reatividade do Teste de Montenegro no diagnóstico da leishmaniose cutânea na Amazônia, usando-se dois antígenos brutos para elicitar a reação: *L.(V.) braziliensis* versus *L. (L.) amazonensis*. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.**, v.32, supp. II, p.147, 1999.

- SILVEIRA, T.G.V; ARRAES, S.M.A.A.; BERTOLINI, D.A.; TEODOR, U.;
LONARDONI, M.R.; ROBERTO, A.C.B.S.; RAMOS, M.; NERILO
SOBRINHO, A.; ISHIKAWA, E.; SHAW, J. Observações sobre o diagnóstico
laboratorial e epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná,
sul do Brasil. **Rev. Soc. Brás. Med. Trop.**, v.32, p.413-23, 1999.
- SJÖLANDER, A.; BALDWIN, T.M.; CURTIS, J.M.; BENGTSSON, K.L.;
HANDMAN, E. Vaccination with recombinant parasite surface antigen 2 from
Leishmania major induces a Th1 type of immune response but does not protect
against infection. **Vaccine**, v.16, p.2077-84, 1998.
- SOTO, J.V.; FUYA, P.; HERRERA, R.; BERMAN, J. Topical
paromomycin/methylbenzethonium chloride plus parenteral meglumine
antimonate as treatment for american cutaneous leishmaniasis: controlled study.
Clin. Infec. Dis., v.26, p.56-8, 1998.
- SOTO, J.V.; TOLEDO, J. GUTIERREZ, P.; PADILHA, J.; ENGEL, J.; FISCHER,
C.; VOSS, A.; BERMAN, J. Treatment of american cutaneous leishmaniasis
with miltefosine, an oral agent. **Clin. Infec. Dis.**, v.33, p.57-61, 2001.
- SOTTO, M.N.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E.H.; DA MATTA, V.L.; DE
BRITO, T. Cutaneous leishmaniasis of the New World: diagnostic
immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. **Acta Tropica**,
v.476, p.121-30, 1989.
- STANIMIROVIC, A.; STIPIC, T.; SKERLEV, M.; BASTA-JUZBASIC, A.
Treatment of cutaneous leishmaniasis with 20% paromomycin ointment. **J. Eur.
Acad. Venereol.**, v.13, p.214-7, 1999.

THE CARLO DENEGRI FOUNDATION. Atlas Medical Parasitology. Website

<http://www.cdfound.to.it/default.htm>

UEZATO, H.; HAGIWARA, K.; HOSOKAWA, A.; MARUNO, M.; NONAKA, S.;
OSHIRO, M.; NAKASHIMA, Y.; FURUYA, M.; HASIGUCHI, Y.

Comparative studies of the detection rates of *Leishmania* parasites from formalin, ethanol-fixed, frozen human skin specimens by polymerase chain reaction and Southern blotting. **J. Dermatol.**, v.25, p.623-31, 1998.

ULIANA, S.R.B.; NELSON, K.; BEVERLEY, S.M.; CAMARGO, E.P.; FLOETER-WINTER, L.M. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived Oligonucleotides. **J. Euk. Microbiol.**, v.41, p.324-30, 1994.

UYEMURA, K. et. al. CD4⁺ type 1 and CD8⁺ type 2 T cell subsets in human leishmaniasis have distinct t cell receptor repertoires. **J. Immunol.**, v.151, p.7095-7104, 1993.

VALLI, L.C.P.; PASSOS, V.M.A.; DIETZE, R.; CALLAHAN, H.L.; BERMAN, J.; GROGL, M. Humoral immune response among mucosal and cutaneous leishmaniasis patients caused by *Leishmania braziliensis*. **J. Parasitol.**, v.85, p.1076-83, 1999.

VITOIR, K.; DE DONCKER, S.; CABRERA, L.; ALVAREZ, E.; ARÉVALO, J.; LLANOS-CUENTAS, A.; LE RAY, D.; DUJARDIN, J.C. Direct identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with American tegumentary leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.97, p.80-7, 2003.

VOLPINI, A C. **Diferenciação de *Leishmania (Viannia) braziliensis* & *Leishmania (Leishmania) amazonensis* utilizando variantes da reação em**

cadeia da polimerase (PCR). Belo Horizonte, 2000. 89p. Dissertação

(Mestrado) – Fundação do Instituto Oswaldo Cruz FIOCRUZ.

VOLPINI, A.C.; PASSOS, V.M.A.; ROMANHA, A.J. Attempt to differentiate

Leishmania (Leishmania) amazonensis, *L. (L.) chagasi*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, and *L. (V.) guyanensis* using the SSR-PCR technique. **Parasitol. Res.**, v.87, p.1056-9, 2001.

WEIGLE, K.A.; DE DÁVALOS, M.; HEREDIA, P.; MOLINEROS, R.; SARAIVIA, N.G.; D’ALESSANDROS, A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous

leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.36, p.489-96, 1987.

WEIGLE, K.A.; SANTRICH, C.; MARTINEZ, F.; VALDERRAMA, L.; SARAIVIA, N.G. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: environmental and

behavioral risk factors for infection, clinical manifestations, and pathogenicity. **J Infect Dis.**, v.168, p.709-14, 1993.

WEIGLE, K.A.; SARAIVIA, N.G. natural history, clinical evolution, and host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v.14, p.433-50, 1996.

WEIGLE, K.A.; LABRADA, L.A.; LOZANO, C.; SANTRICH, C.; BARKER, D.C. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.601-6, 2002.

WHO, 2002. Website: <http://www.who.ch/programmes/ctd/act/leisact.htm>.

WILSON, S.M. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: field application and practicalities. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.89, p.95-100, 1995.

ZER, R.; YAROSLAVSKI, I.; ROSEN, L.; WARBURG, A. Effect of sandfly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. **Int. J. Parasitol.**, v.31, p.810-14, 2001.