HÉLIO ARTHUR BACHA

**Identificação molecular das espécies de leishmânia
em lesões cutâneas de pacientes atendidos no
Centro de Controle de Zoonoses de Santarém, Pará**

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. Valdir Sabbaga Amato

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bacha, Hélio Arthur

Identificação molecular das espécies de leishmânia em lesões cutâneas de
pacientes atendidos no Centro de Controle de Zoonoses de Santarém, Pará / Hélio
Arthur Bacha. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Valdir Sabbaga Amato.

Descritores: 1.Leishmaniose cutânea 2.Leishmaniose/classificação 3.Reação em
cadeia da polimerase 4.Amazônia

USP/FM/SBD-279/09

HÉLIO ARTHUR BACHA

**Identificação molecular das
espécies de leishmânia em lesões
cutâneas de pacientes atendidos
no Centro de Controle de Zoonoses
de Santarém, Pará**

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: Professor Valdir Sabbaga Amato

São Paulo

2009

DEDICATÓRIA

À memória do Professor Américo Piquet Carneiro, meu mestre
para a vida toda.

AGRADECIMENTOS

Pessoas que foram essenciais para o desenvolvimento, achados e correções deste trabalho. Os erros são de responsabilidade unicamente minha.

Professor Dr. Valdir Sabbaga Amato

Professora Dra. Maria Irma Seixas Duarte

Professor Dr. Vicente Amato Neto

Professora Dra. Lucile Maria Floeter-Winter

Professor Dr. Heitor Franco de Andrade Junior

Professor Dr. Aluisio Augusto Cotrim Segurado

Professor Dr. Marcos Boulos

Professor Dr. Moisés Goldbaum

Professor Dr. Jeffrey Jon Shaw

Professora Dra. Vera Lúcia Fonseca de Camargo-Neves

Dr. Felipe Francisco Tuon

Biólogo Ricardo Andrade Zampieri

Estatística Paula Strassmann

Dra. Melissa Mascheretti

Bibliotecária Marinalva de Souza Aragão

Yvonne Lilian Eisenberg Sarue

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. I. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação;2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	5
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 Leishmaniose – apresentações clínicas	10
2.2 Lesões cutâneas – evolução e formas clínicas.....	11
2.3 Leishmaniose Tegumentar Americana e AIDS	14
3 LTA – Espécies.....	17
3.1 <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	18
3.2 <i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	18
3.3 <i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>	21
3.4 <i>Leishmania (Viannia) shawi</i>	25
3.5 <i>Leishmania (Viannia) lindenbergi</i>	26
3.6 <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	27
3.7 <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	28
3.8 Diagnóstico	29
3.9 Amplificação genômica	30
3.10 Técnica de sequenciamento por PCR de SSU – rDNA	31
3.11 Técnica de PCR (G6PD).....	32
3.12 Preceitos legais e éticos	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Área de estudo.....	35
4.2 Consentimento pós-informado	35
4.3 Critérios de inclusão	36
4.4 Critérios de exclusão	36
4.5 Avaliação diagnóstica em todos os pacientes incluídos.....	37
4.6 As amostras	38
4.7 Extração de DNA do material de biópsia	38
5 REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE (PCRs).....	39
5.1 PCR com oligonucleotídeos baseada na sequência do gene G6PD	39

5.2 PCR com oligonucleotídeos – sequência do gene SSU rDNA	40
6 RESULTADOS.....	41
6.1 Análise estatística	46
6.1.1 Metodologia	46
6.2 Distribuição dos casos por municípios	48
6.3 Espécies por municípios	51
6.3.1 Metodologia	51
6.3.2 Resultados	51
6.4 Localização das lesões por espécie	62
6.4.1 Metodologia	62
6.4.2 Resultados	63
7 DISCUSSÃO	65
7.1 Espécies	67
7.2 Distribuição dos casos por gênero.....	71
7.3 Idade.....	73
7.4 Município de contaminação	74
7.5 Tempo de evolução por espécie	75
7.6 Número de lesões por espécie	76
7.7 Local de lesão.....	78
7.8 Observação final	80
8 CONCLUSÕES.....	82
9 REFERÊNCIAS	84
10 ANEXO	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Série histórica dos casos de LTA no Brasil de 1980 a 2005.....	7
Figura 2 – Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil	11
Figura 3 – PCR – SSU rDNA – <i>Trypanosomatidae</i>	41
Figura 4 – PCR – SSU rDNA – <i>Leishmania</i>	42
Figura 5 – G6PD – <i>Leishmania (Viannia)</i>	43
Figura 6 – G6PD – <i>Leishmania (Viannia)braziliensis</i>	44
Figura 7 – G6PD – <i>Leishmania (Viannia)</i> não <i>braziliensis</i>	45
Figura 8 – Frequência de espécies encontradas (%).....	47
Figura 9 – Distribuição de casos por municípios.....	50
Figura 10 – Gráfico de distribuição dos casos por município.....	50
Figura 11 – Distribuição de espécies por municípios.....	52
Figura 12 – Mapa de distribuição dos casos.....	53
Figura 13 – Distribuição de sexo por espécies	55
Figura 14 – Idade por espécie – Média e IC de 95%	56
Figura 15 – Tempo de evolução por espécie – Média e IC de 95%.....	57
Figura 16 – Tempo de evolução por espécie – Média e IC de 95%.....	59
Figura 17 – Número de lesões por espécie – Média e IC de 95%	60
Figura 18 – Número de lesões por espécie – Média e IC de 95%	61
Figura 19 –Número de lesões por espécie (%).....	62
Figura 20 –Localização das lesões por espécie (%).....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies – frequência e percentual	47
Tabela 2 – Variáveis por sexo.....	48
Tabela 3 – Município – frequência e percentual	49
Tabela 4 – Município por espécie	51
Tabela 5 – Idade por espécie	54
Tabela 6 – Sexo por espécie	54
Tabela 7 – Sexo por espécie (espécies agrupadas)	55
Tabela 8 – Idade por espécie	56
Tabela 9 – Tempo de evolução por espécie	57
Tabela 10 – Tempo de evolução em dias por espécie.....	58
Tabela 11 – Número de lesões por espécie	59
Tabela 12 – Número de lesões por espécie (com limite de nº de lesões)	60
Tabela 13 – Número de lesões por espécies agrupadas	61
Tabela 14 – Localização das lesões por espécie.....	63
Tabela 15 – Localização das lesões por espécie.....	64

LISTA DE SIGLAS

CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
DAT	teste de aglutinação direta
DNA	ácido desoxirribonucleico
ELISA	ensaio imunoenzimático
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GIPL	glicoinositolfosfolípídeo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Pesquisa
IDRM	intradermorreação de Montenegro
IFA	imunofluorescência indireta
IL-4	Interleucina 4
LC	leishmaniose cutânea
LCD	leishmaniose cutânea difusa
LM	leishmaniose mucosa
LTA	leishmaniose tegumentar americana
PCR	reação em cadeia da polimerase
rDNA	DNA ribossômico
RNA	ácido ribonucleico
SSU-r	subunidade ribossômica menor
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β
USP	Universidade de São Paulo

RESUMO

Bacha, HA. *Identificação molecular das espécies de leishmânia em lesões cutâneas de pacientes atendidos no Centro de Controle de Zoonoses de Santarém, Pará* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é doença endêmica no Brasil onde apresenta aumento contínuo do número de casos bem como expansão da área geográfica de detecção de casos. Na Amazônia, a situação epidemiológica da LTA é ainda mais complexa, pois há várias espécies de leishmânia como agente causal da doença, cada espécie com seus reservatórios e vetores próprios podendo determinar diferentes quadros clínicos com diversas respostas ao tratamento medicamentoso. O município de Santarém situa-se no oeste do estado do Pará, onde há alta endemicidade da LTA. A participação de cada espécie de leishmânia nos casos de leishmaniose cutânea (LC) na região não é ainda conhecida através de estudos definitivos. Este trabalho tem como objetivo principal identificar as espécies de leishmânia nos casos de pacientes portadores de LC atendidos no Centro de Controle de Zoonoses de Santarém (CCZS) no ano de 2003, e estudar a possibilidade de diferenças significativas na apresentação clínica das lesões causadas pelas diferentes espécies do parasito. Através de duas técnicas moleculares, uma através de identificação de sequência de nucleotídeos que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal e outra que identifica sequência de gene que codifica a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, aplicadas em material de biópsia de 93 pacientes atendidos no CCZS, durante o ano de 2003, identificamos espécies de leishmânias. Com os métodos realizados consegue-se diferenciar *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *Leishmania* (L.) *amazonensis* e o grupo de outras espécies do gênero *Leishmania* (V.) que não *Leishmania* (V.) *braziliensis* a que chamamos *Leishmania* (L.) outras espécies. As espécies encontradas e suas proporções foram: *Leishmania* (V.) *braziliensis* 57%, *Leishmania* (V.) outras espécies 37% e *Leishmania* (L.) *amazonensis* 5%. Encontrou-se maior proporção de lesões em membros inferiores nos casos ocasionados por *Leishmania* (V.) *braziliensis*. Não foram encontradas diferenças significativas em outras características clínicas analisadas, tais como sexo, idade e número de lesões.

Descritores: 1.Leishmaniose cutânea 2.Leishmaniose/classificação
3.Reação em cadeia da polimerase 4.Amazônia

SUMMARY

Bacha, HA. *Molecular identification of the species of leishmania in cutaneous injuries of patients taken care in the Center of Zoonoses Control of the City of Santarém, Pará* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009.

Tegumentary leishmaniasis (TL) is an endemic disease in Brazil, where it shows a continual rise in the number of cases, as well as geographic expansion in the area of detected cases. In the Amazon, the epidemiological situation of TL is even more complex because there are several species of leishmania as causal agent of the disease, each species with its own reservoir hosts and sandfly vectors being able to determine different clinical expressions with diverse responses to medical treatment. The municipality of Santarém is located in the western part of the state of Pará, where there are high endemic levels of TL. The participation of each species of leishmania in the cases of cutaneous leishmaniasis (CL) in the region has not yet been determined through definitive studies. The principal object of this study is to identify the species of leishmania in the cases of carriers who were patients at the Santarém Zoonosis Control Center in the year 2003, and to study the possibility of significant differences in the clinical presentation of lesions caused by different species of the parasite. We identified species of *Leishmania* using two molecular techniques, the first through identifying the sequence of nucleotides that encodes the smaller subunit of ribosomal RNA and another that identifies the gene sequence that encodes the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase applied to biopsy material from 93 patients of the Santarém Zoonosis Control Center, during the year 2003. Using these methods we were able to differentiate *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *Leishmania* (L.) *amazonensis* and the other species of the genus *Leishmania* (V.) that were not *Leishmania* (V.) *braziliensis* which we call *Leishmania* (L.) of other species. The species found and their proportions were: *Leishmania* (V.) *braziliensis* 57%, *Leishmania* (V.) other species 37%, and *Leishmania* (L.) *amazonensis* 5%. A greater proportion of lesions was found in inferior members in the cases of *Leishmania* (V.) *braziliensis*. Significant differences were not found in other analyzed clinical characteristics, such as sex, age, and number of lesions.

Descriptors: 1. cutaneous leishmaniasis 2. Leishmaniasis/classification 3. Polymerase chain reaction 4. Amazonia

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um importante problema de saúde, especialmente em regiões tropicais e subtropicais de países em desenvolvimento. A leishmaniose tegumentar americana (LTA) provoca doença com lesões cutâneas e cutâneo-mucosas, com aspecto antiestético, algumas vezes até deformante, porém raramente letal. A espécie *Leishmania (V.) braziliensis*, em especial, pode causar apresentação mucosa da doença que se mostra ainda mais grave pelas lesões nas mucosas da boca e da faringe, que pode levar, inclusive, à destruição das cartilagens nasais. ⁽¹⁾

A Organização Mundial de Saúde estima que, no mundo, há cerca de um milhão de novos casos de LTA por ano. ⁽¹⁾

No Brasil, a LTA aparece em todos os Estados da Federação, especialmente nas regiões Nordeste e Norte. São notificados cerca de 30.000 casos por ano, embora seja importante ressaltar que a real prevalência é difícil de ser estabelecida devido à falta de notificação e à incorreção no diagnóstico da doença. ⁽²⁾

A infecção no ser humano é um acidente, uma vez que o homem não faz parte da cadeia obrigatória de transmissão do parasito. Historicamente, os casos de doença ocorreram quando o homem entrou em contacto com o ecossistema florestal primitivo, onde coexistiam mamíferos reservatórios e insetos vetores do agente etiológico, que é um protozoário. No Brasil, a LTA apresenta alterações em seu perfil epidemiológico, com

surgimento de focos endêmicos não relacionados com a transmissão habitual silvestre clássica, com observação de número crescente de casos de LTA adquirida em região periurbana de grandes cidades.^(3,4) Nos últimos anos, a importância da LTA vem crescendo significativamente, o número de casos tem sido progressivamente maior, mesmo em regiões onde as florestas naturais praticamente desapareceram, como no Estado de São Paulo.⁽⁵⁾

A LTA pode apresentar-se na forma cutânea ou mucosa.⁽²⁾ A leishmaniose mucosa (LM) possui apreciável expressão clínica, especialmente por seu comprometimento de mucosa, com envolvimento das fossas nasais que pode levar à perfuração de septo. Pode permanecer como um processo latente ou evoluir com disseminação pela região de orofaringe, hipofaringe e até traquéia. Na situação de acometimento em faringe e laringe, ocasiona dificuldade para a deglutição e assim leva à desnutrição, além de eventualmente provocar aspiração e/ou obstrução de vias aéreas que causam importante risco de vida ao enfermo. O envolvimento da traquéia pode determinar dispnéia e provocar insuficiência respiratória grave que pode levar o paciente a óbito.⁽⁶⁾

No período de 1997 a 2007, segundo o Ministério da Saúde, foram notificados 111.754 casos de LTA, na Região Norte do Brasil. Deste total, 46.483 ocorreram no Estado do Pará, ou seja, essa unidade da Federação foi, isoladamente, responsável por 41,6% do total de casos.⁽⁷⁾

O município de Santarém, segunda cidade em termos populacionais do Pará, localiza-se a oeste do Estado, na Mesorregião do

Baixo Amazonas, a 36m de altitude, na confluência dos rios Amazonas e Tapajós. Situa-se a 1.369 km de distância da capital do estado (807 km em linha reta) e ocupa uma área de 24.254 km², com uma população de 278.118 habitantes (estimativa para 2007. Destes habitantes, cerca de 80.000 pessoas moram em área rural. ^(8,9) Santarém é referência de serviço de saúde para o oeste do Estado, devido aos seus recursos médicos assistenciais e às suas vias de acesso, tanto rodoviárias como, e principalmente, hidroviárias. ⁽⁸⁾ As principais atividades econômicas da região situam-se nas áreas de extrativismo (mineral e vegetal), agricultura, pecuária e indústrias (madeireira, mineração e alimentícia). ⁽¹⁰⁾

O clima é quente e úmido com temperatura média anual variando de 25°C a 28°C. Apresenta pluviosidade média de 1.920 mm. As temperaturas mais elevadas ocorrem entre os meses de junho a novembro e o período de maior precipitação pluviométrica ocorre entre dezembro e maio. ⁽⁸⁾

A LTA, na região amazônica, tem como agentes etiológicos várias espécies de leishmânias, cada uma delas determinando quadros clínicos e respostas terapêuticas extremamente diversas e específicas. ⁽¹¹⁾

O Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da FMUSP e a Secretaria Municipal de Saúde de Santarém firmaram um convênio para implantar novas ações de saúde na região, através do treinamento e capacitação de profissionais de saúde em ações específicas naquele município ou em São Paulo, além de atividades nas unidades de saúde da prefeitura. Esse convênio tem também a finalidade de

qualificar as unidades de diagnóstico, a realização de projetos de pesquisa para conhecer a situação epidemiológica regional e promover a cooperação acadêmica na formação e treinamento de médicos residentes do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da FMUSP em doenças endêmicas da região de Santarém.

A LTA é considerada como uma “doença negligenciada” ⁽¹⁾ devido à falta de estudos epidemiológicos específicos, assim como à ausência de identificação da distribuição relativa das espécies causadoras desta enfermidade.

O conhecimento dos agentes causadores da LTA torna-se ainda mais necessário nos casos de pacientes da região amazônica, onde há expressivo número de casos que exibem diversidade clínica e epidemiológica. ⁽¹²⁾ O município de Santarém, pólo de referência regional, recebe indivíduos com LTA de várias localidades do Estado do Pará, fato que acaba propiciando o estudo da identificação de espécies de enfermos que provêm das diferentes sub-regiões.

A análise das características clínicas dos recursos diagnósticos disponíveis regionalmente e da identificação das espécies causadoras da LC de pacientes é essencial para a compreensão da endemia na região, visto que diferentes espécies de leishmânia apresentam evoluções clínicas e peculiaridades epidemiológicas próprias. Para efetuar essa análise é importante caracterizar o perfil epidemiológico da LTA na região de Santarém. Sabe-se que diferentes espécies de *Leishmania* podem apresentar respostas terapêuticas diferentes aos medicamentos atualmente

disponíveis, ⁽¹¹⁾ sendo, pois, necessário o conhecimento das particularidades da leishmaniose de uma dada região a fim de proporcionar melhor assistência aos pacientes e aprimorar o entendimento da epidemiologia de cada espécie do parasito, reservatórios, formas de exposição, vetores e apresentações clínicas típicas. ⁽¹³⁾

Neste estudo, temos como propósito identificar as espécies que ocasionam a leishmaniose cutânea em pacientes atendidos no Centro de Controle de Zoonoses de Santarém (CCZS), local onde se presta atendimento assistencial a pacientes com esta enfermidade, provenientes de uma região onde o número de espécies causadoras de LC é extremamente diversificado. ⁽¹⁴⁾

1.1 Objetivos

Ao estudar casos de leishmaniose cutânea em pacientes atendidos no CCZS, os objetivos do presente trabalho são:

1. Identificar as espécies de leishmânia em pacientes com diagnóstico de LC, atendidos no CCZS.
2. Estudar as características clínico-epidemiológicas: idade, sexo, tempo de evolução das lesões cutâneas, número de lesões cutâneas e município de aquisição.

2 REVISÃO DA LITERATURA

As leishmanioses do continente americano são autóctones, de existência pré-colombiana e, provavelmente, existem desde a chegada do *Homo sapiens* no continente, entre 30.000 a 10.000 anos atrás, como pode ser comprovado ao observar estatuetas e múmias indígenas com mais de 4.000 anos com formas esculpidas representando lesões típicas da LC. ⁽¹⁾ Há peças de cerâmicas pré-colombianas onde estão esculpidas lesões mutiladoras de nariz e lábio superior típicas de LM que têm como agente causal principal a *Leishmania (V.) braziliensis*, espécie só encontrada no continente americano.

Atribui-se às dinâmicas populacionais, entre as regiões amazônica e andina, a disseminação continental da doença. ⁽¹⁵⁾

As leishmanioses são doenças de notificação compulsória no Brasil onde, atualmente, são registrados cerca de 35.000 a 40.000 casos de LTA e 5.000 a 6.000 casos de LV(7). Nas últimas duas décadas vem ocorrendo o crescimento progressivo do número de casos de ambas as formas clínicas.⁽⁷⁾

Figura 1 – Série histórica dos casos de LTA no Brasil de 1980 a 2005

Fonte: COVEC / DEVEP / CGDT / SVS-MS

O padrão epidemiológico das leishmanioses tem sofrido alterações progressivas. Tradicionalmente definida como doença de zona rural, relacionada a desmatamentos e acometendo indivíduos com baixo nível sócio econômico, hoje atinge cada vez mais populações de áreas periurbanas. Casos isolados e epidemias vêm acometendo a periferia e o interior de centros urbanos. ⁽¹⁶⁾

As leishmanioses atravessam um processo de expansão geográfica crescente que decorre da própria ação humana modificadora de áreas de florestas quando as transforma em regiões semiurbanizadas. ⁽¹⁷⁾

Exemplo da importância da nova situação epidemiológica das leishmanioses é o Estado de São Paulo onde, no ano de 1999, começaram a surgir casos autóctones tanto de LTA como de LV em cidades de grande e médio porte do interior do estado. ⁽¹⁸⁾

As leishmanioses são enfermidades causadas por várias espécies de protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família

Trypanomastidae, gênero *Leishmania*, que acometem o homem e diferentes espécies de animais. ⁽¹⁹⁾ Nas Américas, a LTA é transmitida dos animais reservatórios para o homem pela picada das fêmeas de diversas espécies de flebótomos. No hospedeiro vertebrado, a leishmânia apresenta-se sob a forma amastigota, aflagelada, oval ou arredondada, com dois a cinco micra de diâmetro, parasitando células do sistema fagocítico mononuclear. Na técnica de Giemsa o citoplasma se cora em azul e seu grande núcleo em vermelho. ⁽²⁰⁾

No vetor invertebrado a leishmânia, após atingir o tubo digestivo do inseto, apresenta-se com forma fusiforme, de comprimento que varia de 10 a 15 micra por 1,5 a 3,5 micra de largura, com um flagelo longo, maior do que o corpo. Essa forma recebe a denominação de promastigota. ^(20,21)

As espécies de leishmânia diferenciam-se por seu diâmetro celular, dimensão e posição do cinetoplasto e do núcleo. Podem, ainda, distinguir-se por características sorológicas (anticorpos monoclonais específicos), bioquímicos (densidade de flutuação do DNA nuclear e do cinetoplasto) bem como, também, por métodos moleculares (reação em cadeia da polimerase, hibridização, análise eletroforética de produtos de DNA do cinetoplasto clivados por enzimas de restrição). ⁽²²⁻²⁴⁾

São descritas cerca de 20 espécies de leishmânia capazes de causar doença no homem, agrupadas em dois subgêneros, *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*), de acordo com o tipo de desenvolvimento da forma promastigota no intestino do vetor. As espécies

do gênero *Leishmania* (*Sauroleishmania*) infectam o lagarto, mas não são patogênicas no homem. ⁽²⁵⁾

Algumas espécies estão associadas, preferencialmente, a determinadas formas clínicas: a leishmaniose visceral com *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*; a forma cutânea difusa com a *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*; a leishmaniose mucosa com a *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*. ⁽³⁾

A região amazônica apresenta alta prevalência de leishmaniose tegumentar com um grande número de espécies de leishmânias autóctones como agentes da doença. São espécies causadoras de leishmaniose cutânea na região amazônica: ⁽¹²⁾

1. *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*
2. *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*
3. *Leishmania* (*V.*) *guyanensis*
4. *Leishmania* (*V.*) *shawii*
5. *Leishmania* (*V.*) *lindenbergi*
6. *Leishmania* (*V.*) *lainsoni*
7. *Leishmania* (*V.*) *naiffi*

O prognóstico, complicações e resposta terapêutica aos medicamentos disponíveis são distintos conforme a espécie causal. ⁽²⁶⁾ Cada espécie tem seus reservatórios e vetores preferenciais. ⁽²⁷⁾

Múltiplos parasitos, múltiplos vetores e diversidade sócio-demográfica fazem com que a leishmaniose tegumentar tenha características epidemiológicas e clínicas complexas na região amazônica.

Conhecemos apenas um estudo que descreve agentes causais em casos de leishmanioses tegumentar autóctones nessa região de Santarém. Nesse trabalho, apresentado por Jennings em 2003, ⁽²⁸⁾ são descritas espécies causais de leishmaniose tegumentar identificadas por método isoenzimático e anticorpos monoclonais em 43 amostras de material coletado em pacientes provenientes da região do município de Santarém que foram submetidas a cultivo em meio apropriado e em *hamster*. Não há descrição do método de seleção desses pacientes.

Nesse trabalho ⁽²⁸⁾ a autora encontrou como resultado:

Total 43 amostras

<i>L. (V.) braziliensis</i>	11	25,28%
<i>L. (V.) guyanensis</i>	20	46,50%
<i>L. (L.) amazonensis</i>	02	4,60%
<i>L. (V.) shawi</i>	04	9,30%
<i>L. (V.) lainsoni</i>	06	13,95%

2.1 Leishmaniose – apresentações clínicas ^(29,30)

A LTA é caracterizada por duas formas clínicas principais: a leishmaniose cutânea e a leishmaniose mucosa.

Figura 2

Anexo H – Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil, Classificação Clínica e Respectivos Agentes Etiológicos segundo Marzochi

Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª Ed. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2007

2.2 Lesões Cutâneas – evolução e formas clínicas

Apresentações clínicas da LTA: ⁽²⁹⁾

- a) Infecção inaparente – há sorologia reagente e positividade da intradermorreação de Montenegro e não se observa nenhuma

lesão aparente, tanto cutânea como mucosa, nem história prévia da doença. O potencial de evolução para formas clínicas aparentes dessa apresentação não é conhecido.

- b) Linfonodal – apresenta-se isoladamente como linfadenopatia sem lesão de pele aparente ou prévia. Pode preceder a lesão cutânea, no entanto, se distingue da linfadenite reacional secundária à lesão.
- c) Cutânea – geralmente manifesta-se em área exposta de pele com forma ovalada ou arredondada. Seu diâmetro varia desde alguns milímetros até centímetros. A lesão típica é indolor, entretanto, pode haver dor quando há infecção bacteriana secundária. Mesmo sem tratamento é possível evoluir para cura em um período que pode durar meses ou anos. As apresentações clínicas desta forma podem ser:
 - Forma cutânea localizada: a lesão, geralmente, apresenta-se como úlcera única ou múltipla. As lesões múltiplas são, comumente, causadas pela espécie *Leishmania (Viannia) guyanensis*, talvez em decorrência de seu vetor *Nyssomyia umbratilis* ter a característica de causar várias picadas em um mesmo paciente;⁽³¹⁾
 - Forma cutânea múltipla: apresenta-se como múltiplas lesões que se localizam em vários segmentos do corpo. Geralmente a face e o tronco estão envolvidos. As espécies que são reconhecidas como agentes desta

apresentação clínica são *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*. A aparência das lesões papulares é acneiforme. A reação adenolinfocitária, que pode ser encontrada na forma cutânea localizada, é muito raramente observada nesta forma da doença e os antígenos do parasito são raramente identificados;^(29,32,33)

- Forma cutânea difusa: ocorre com lesões cutâneas em pacientes com depressão da imunidade celular. Os casos notificados são raros. Inicia-se por intermédio de uma pápula que não se ulcera. A partir dela as formas amastigotas disseminam-se para áreas de pele distantes do foco inicial, e a moléstia assume evolução crônica. A leishmaniose cutânea difusa é a apresentação anérgica da LC. Esta variedade da doença foi observada inicialmente na Venezuela, tendo como característica clínica a presença de lesões papulares ou nodulares, com tendência à disseminação e à evolução por surtos, na qual o acometimento das mucosas está ausente ou é discreto. Geralmente há resistência ao tratamento com antimoniais, e a anergia ou hipoergia é evidenciada pelo resultado negativo da reação de Montenegro.⁽³³⁾ No Brasil, a espécie identificada como agente causal dessa apresentação da doença é a *Leishmania (L.) amazonensis*. Em outros países, outras espécies foram identificadas: *Leishmania*

(*L.*) *pifanoi*,⁽³⁴⁾ *Leishmania* (*L.*) *tropica*,⁽³⁵⁾ *Leishmania* (*L.*) *aethiopica*.⁽³⁶⁾

- Recidiva cútis: caracteriza-se por recidiva após a cicatrização da lesão cutânea inicial, tanto por cura espontânea ou como resposta terapêutica. As lesões recidivas geralmente ocorrem na borda de cicatriz da lesão. Tem baixa resposta ao tratamento medicamentoso.⁽³⁷⁾

2.3 Leishmaniose Tegumentar Americana e AIDS

A leishmaniose cutânea pode se apresentar como doença oportunista em pacientes com AIDS. Coura e colaboradores relataram o primeiro caso diagnosticado no Brasil de disseminação de leishmaniose tegumentar americana, presumivelmente causado por *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, em paciente com infecção inaparente pelo vírus da imunodeficiência humana que apresentava menos de 200 linfócitos CD4+/mm³ no sangue.⁽³⁸⁾ Machado e cols. (1992),⁽³⁹⁾ Hernández e cols. (1995)^(40,41) e Alvar e cols. (1997)⁽⁴²⁾ descreveram outros casos com forma disseminada de LTA em doentes com AIDS, cujo agente etiológico foi *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*. Em 1999, Borges e cols. (1999) relataram mais casos de leishmaniose tegumentar em doentes com AIDS, observados no Brasil.⁽⁴³⁾

Diferentemente do que ocorre no Brasil, em países do Mediterrâneo, principalmente Espanha, Portugal, França e Itália, a maioria dos casos de coinfecção HIV/AIDS ocorre em usuários com adicção a drogas ilícitas injetáveis. ⁽⁴⁴⁾

Pacientes portadores do vírus do HIV, mesmo aqueles com imunodepressão moderada (pacientes com linfócitos CD4+ > 200 células/mm³), que apresentam coinfecção com leishmaniose cutânea, esta tem maior número de recidiva ou reinfecção e menor índice de cura quando comparados com pacientes com leishmaniose cutânea não infectados pelo vírus. ⁽⁴⁵⁾ Nos pacientes coinfectados, com imunodepressão mais grave, aqueles com linfócitos CD4+ <200 células/mm³, as formas de apresentação das lesões cutâneas da LC são ainda mais atípicas. Além das apresentações mucosas em grande número de casos, surgem úlceras em áreas não comuns como lábios e genitália. ⁽⁴⁶⁾

O Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento da Coinfecção Leishmania-HIV, do Programa DST/AIDS do Ministério da Saúde do Brasil, tendo em vista tratamento adequado e diagnóstico de coinfecção, indica que seja oferecido teste sorológico para HIV aos pacientes portadores de LC que apresentam: ^(47,48)

- Qualquer forma clínica sem exposição recente (durante o último ano) a uma área de transmissão de leishmaniose;
- Forma disseminada com ou sem acometimento mucoso concomitante;
- Forma mucosa com acometimento fora da cavidade nasal;

- Forma cutânea ou forma mucosa com achados de parasitos em vísceras;
- Forma difusa;
- Qualquer forma clínica associada à reação de Montenegro negativa;
- Achado de amastigotas no exame direto de material obtido de lesões mucosas;
- Isolamento em material de pele ou mucosa de espécies de *Leishmania* viscerotrópicas – *Leishmania (Leishmania) chagasi* – ou não descritas como causadoras de lesões tegumentares;
- Falha terapêutica após uso de antimonial pentavalente;
- Recidiva tardia (mais de seis meses após a cura clínica); e
- Lesões cutâneas que aparecem após o diagnóstico de lesão mucosa em atividade.

Segundo dados do projeto desenvolvido pela Rede Brasileira de Coinfecção *Leishmania*/HIV, coordenado pela Professora Dr^a. Alda Maria da Cruz (Fiocruz/RJ), que congrega vários Centros de Pesquisa no Brasil, desde 2005 foram detectados 26 casos de LTA de coinfecção HIV/AIDS. A maioria dos pacientes apresentava formas cutâneas e mucosas concomitantes e era proveniente do Estado de São Paulo.⁽⁴⁷⁾

3 LTA – ESPÉCIES

As espécies de leishmânia que possuem maior importância epidemiológica no Brasil são a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.⁽³⁰⁾

Na região da bacia do rio Amazonas, a LTA apresenta uma complexa epidemiologia em função da variedade de espécies de leishmânias envolvidas no mesmo espaço geográfico. Há pelo menos sete espécies conhecidas: uma do subgênero *Leishmania* Ross, 1903 *Leishmania (L.) amazonensis* Lainson and Shaw, 1972 e seis do subgênero *Viannia* Lainson e Shaw, 1987: *Leishmania (V.) braziliensis* Vianna, 1911; *Leishmania (L.) guyanensis* Floch, 1954; *Leishmania (V.) lainsoni* Silveira 1987; ⁽⁴⁹⁾ *Leishmania (V.) naiffi* Lainson 1989; *Leishmania (V.) shawi* Lainson 1989; *Leishmania (V.) lindenbergi*, Silveira et al. ⁽⁵⁰⁾

Há outras espécies de agentes etiológicos da LTA fora da região amazônica brasileira. São elas: do subgênero *Viannia*: *Leishmania (V.) peruviana* Velez, 1913; *Leishmania (V.) panamensis* Lainson e Shaw, 1972; *Leishmania (V.) colombiensis* Kreutzer, 1991. Do subgênero *Leishmania*: *Leishmania (L.) mexicana* Biagi, 1953; *Leishmania (L.) pifanoi* Medina e Romero, 1959; *Leishmania (L.) garnhami* Scorza et al. 1979; *Leishmania (L.) venezuelensis* Bonfante-Garrido, 1980. ⁽³²⁾

3.1 *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

A espécie *Leishmania (L.) amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, lesões anérgicas difusas em indivíduos com deficiência imunológica inata.^(32,33) Pode também, raramente, causar formas de leishmaniose mucosa.⁽⁵¹⁾

A transmissão está associada, geralmente, à presença de roedores silvestres e marsupiais, sendo a infecção humana menos frequente porque seus principais vetores, *Bichromomyia flaviscutellata*, *Bichromomyia reducta* e *Bichromomyia olmeca nociva*, têm hábitos noturnos e vôo baixo e são considerados pouco antropofílicos⁽⁵²⁾. Entretanto, a infecção ocorre em diferentes ambientes das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, provavelmente associada a ciclos enzoóticos de matas residuais.⁽³⁰⁾

3.2 *Leishmania (Viannia) naiffi*

Essa espécie de leishmânia do subgênero *Leishmania (Viannia)* foi descrita em 1989 por Lainson e Shaw⁽⁵³⁾. Seu reservatório identificado foi o tatu (*Dasypus novemcinctus*), no estado brasileiro do Pará. A diferenciação das outras espécies até então descritas deu-se por diferenciação de perfil de isoenzimas. Mostra facilidade de crescimento em meio agar-sangue Diffco

(B47), e dificuldade quando inoculada em pata de hamster. A separação inicial se deu entre as outras espécies de leishmânia pelo subgênero *Leishmania* (*Viannia*). Após essa separação, faltava diferenciá-la das espécies *Leishmania* (V.) *guyanensis*, *Leishmania* (V.) *panamensis* e *Leishmania* (V.) *braziliensis*. A espécie *Leishmania* (V.) *naiffi* foi identificada pelo perfil de isoenzimas⁽⁵³⁾. Além de sua caracterização enzimática, houve identificação por anticorpo monoclonal específico contra o glicoinositolfosfolípídeo (GIPL) da *Leishmania* (V.) *naiffi*, completando a identificação da nova espécie. ^(53,54)

A descrição do tatu como reservatório animal foi muito importante considerando a sua distribuição na América. Estudo realizado nos Estados do Pará e Rondônia demonstrou que mais de 15% desse reservatório apresentavam infecção pela *Leishmania* (V.) *naiffi*. O parasito foi encontrado no fígado, sangue, linfonodo e pele dos animais analisados⁽⁵⁵⁾. Uma vez identificado o reservatório ainda se fazia necessário demonstrar o vetor de transmissão para determinar o agente responsável pelo ciclo silvestre da *Leishmania* (V.) *naiffi*. Durante pesquisas realizadas na década de 90, demonstrou-se que o tatu, de preferência, infectava-se em terra firme, mais frequentemente do que em região de pântano raso. A espécie de flebótomo vetor descrita então foi *Psychodopygus ayrozai*. Posteriormente encontrou-se também o vetor *Psychodopygus squamiventris* infectado pela *Leishmania* (V.) *naiffi*⁽⁴⁹⁾. Descreveu-se, assim, uma nova espécie, em um reservatório de ampla distribuição, com um vetor antropofílico, *Psychodopygus squamiventris*, encontrado em peridomicílio durante a estação chuvosa. ⁽⁵⁶⁾

Outra descrição do vetor ocorreu em região mais ao norte, 30 km após a fronteira com o Brasil, já na Venezuela, na comunidade de Icabaru, onde vários brasileiros desempenham atividade de mineração (ouro e diamante). Foi descrita a presença do vetor bem como diagnosticaram-se vários casos de LTA na região. Entretanto, sobre a espécie de leishmânia envolvida não havia estudos. ⁽⁵⁷⁾ A área central do Amapá foi também descrita como região de grande quantidade desse vetor, tendo sido pesquisada pelo próprio Roberto Naiff. ⁽⁵⁸⁾

Na Guiana Francesa, com o aumento da extração de minérios, agropecuária, construção de estradas e desmatamento, houve mudança no perfil da leishmaniose na região, fato associado à alteração no padrão de dípteros locais. Foi detectada a presença de *Psychodopygus squamiventris*, o que poderia ocasionar a transmissão da *Leishmania (V.) naiffi* naquela área, conhecida pela alta incidência de infecção pela *Leishmania (V.) guyanensis*. ⁽⁵⁹⁾

Após a identificação de todo esse conjunto de fatores de risco, a identificação de casos humanos de infecção pela *Leishmania (V.) naiffi* seria apenas uma questão de busca ativa. A forma clínica que, seguindo o padrão filogenético, deveria apresentar característica de doença cutânea exclusiva, é que deixaria margem a dúvidas. Porém, mais aspectos referentes ao padrão da úlcera e capacidade de desenvolvimento de outras formas cutâneas ficariam a cargo de uma investigação ativa. Os pesquisadores do Instituto Evandro Chagas do Pará que descreveram o agente relataram também casos em humanos. ⁽⁶⁰⁾ No ano seguinte, um grande estudo

avaliando as espécies de leishmânias na região da Bacia Amazônica, Amapá, Amazonas, Pará, e Rondônia, descreveu mais de 10% de *Leishmania (V.) naiffi* em vários isolados humanos e de dípteros⁽⁴⁹⁾. Após a padronização da espécie mais casos clínicos foram identificados, mesmo fora do Brasil.⁽⁶¹⁾ Além do aumento do número, a distribuição geográfica dos casos identificados também cresceu, apresentando diagnóstico de casos no Peru e Equador.^(62,63,64)

3.3 *Leishmania (Viannia) lainsoni*

Esse parasito foi descrito pela primeira vez em 1987.⁽⁶⁵⁾ Da mesma forma que a *Leishmania (V.) naiffi*, esta nova espécie foi classificada em um novo ramo filogenético do subgênero *Leishmania (Viannia)*.^(14,66)

O caso índice que levou à identificação dessa nova espécie também se deu no estado brasileiro do Pará. O perfil de isoenzimas da *Leishmania (V.) lainsoni* diferenciou-a das outras leishmânias conhecidas até então.⁽⁶⁷⁾ O exame de imunofluorescência indireta também demonstrou ausência de reação cruzada contra os outros anticorpos monoclonais da época.⁽⁶⁵⁾

Uma característica destacada pelos autores que descreveram a espécie foi a facilidade de crescimento em meio de cultura, o que a distinguiu das outras espécies do subgênero *Leishmania (Viannia)*.⁽⁶⁸⁾

Detalhes ultraestruturais deste agente são descritos na revisão realizada por José Corrêa, Reginaldo Brazil e Maurilio Soares. ⁽⁶⁹⁾

Algumas semelhanças com a *Leishmania (V.) braziliensis* no sequenciamento de DNA do cinetoplasto ocorreram, mas podem ser separados em espécies diferentes. ^(70,71)

Dois anos após a descrição do primeiro caso, Silveira e colaboradores produziram infecção experimental em primatas, demonstrando a capacidade de expressão de doença neste grupo de mamíferos. ⁽⁷²⁾

A primeira descrição não foi diferente da doença causada pelas outras espécies de *Leishmania (Viannia)* da região norte do Brasil. A lesão era essencialmente cutânea múltipla, com úlceras pequenas e raros nódulos autolimitados. A pesquisa direta foi facilmente positiva devido à abundância de parasitos na lesão ulcerada. Algumas características clínicas da doença causada pela *Leishmania (V.) lainsoni* foram descritas como semelhantes às daquelas da *Leishmania (L.) amazonensis*, como a presença de nódulos e lesões nem sempre ulceradas por longo período (em torno de quatro meses). O padrão histológico das lesões era o mesmo das outras leishmanioses cutâneas localizadas. ⁽⁷³⁾

Essa espécie de leishmânia foi, inclusive, capturada em sangue de paciente com lesões cutâneas durante investigação de sensibilidade de hemocultura no diagnóstico da doença. ⁽⁷⁴⁾

A descoberta do inseto vetor da *Leishmania (V.) lainsoni* se deu em achado de captura de dípteros na região onde foram descritos os primeiros

casos da doença por esse agente. Nas regiões de Benevides e Utinga a captura revelou que a *Trichophoromyia ubiquitalis* apresentava infecção pela *Leishmania (V.) lainsoni*.⁽⁷⁵⁾ Silveira et al. (1991) já haviam considerado que essa espécie de flebótomo não apresenta antropofilia, mas é capaz de picar humanos quando se expõem.⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾ Na floresta de Carajás, no estado do Pará, também foram encontrados *Trichophoromyia ubiquitalis* infectados com *Leishmania (V.) lainsoni*.⁽⁷⁷⁾ Antes mesmo da descrição do primeiro caso, os mesmos pesquisadores que descreveram a nova espécie já haviam descrito a presença de *Trichophoromyia ubiquitalis* na região da Serra dos Carajás.⁽⁷⁷⁻⁷⁹⁾ Mais tarde foram identificados outros vetores além da *Trichophoromyia ubiquitalis*, como a *Pintomyia nuneztovari* na Bolívia e outros vetores ainda estão em estudos.⁽⁸⁰⁾ O vetor também foi descrito em um levantamento no estado do Amapá.⁽⁵⁸⁾

Após a identificação da espécie do protozoário causador de doença e do vetor transmissor, faltava ainda a identificação do reservatório silvestre da *L. (V.) lainsoni*. O reservatório natural foi descrito em 1991 durante investigação na região de Tucuruí, em Tocantins.⁽⁷⁶⁾

Identificou-se *Leishmania (V.) lainsoni* em lesões cutâneas em paca (*Agouti paca*), mamífero roedor que se alimenta de frutas ou raízes e que, como a capivara, era distribuída, originariamente, em quase todo Brasil. A paca é encontrada na América do Sul, desde a bacia do Orenoco até o Paraguai. Ela vive nas florestas tropicais, de preferência perto de um rio ou riacho e é a caça habitual dos ianomâmis. Mesmo na paca, as lesões da

Leishmania (V.) lainsoni foram apenas cutâneas, não sendo isolado o agente em vísceras.⁽⁷⁶⁾

Embora o reservatório conhecido seja único e o vetor pouco disseminado, a doença cutânea causada pela *Leishmania (V.) lainsoni* já foi descrita no Pará, Amapá e Rondônia, além de outros países da América Latina, como Peru e Bolívia.⁽⁸¹⁻⁸³⁾ Em sua revisão, Correa e colaboradores observaram que os casos fora do Brasil ocorreram em regiões centrais naqueles países, sem uma referência de casos contíguos ou em regiões próximas.⁽⁶⁹⁾

Em resumo, a *Leishmania (V.) lainsoni* é uma espécie com características próprias, tanto bioquímicas como de estimulação de anticorpos, com vetor e reservatório natural específicos.⁽⁸⁴⁾ Além disso, características microscópicas e de cultivo também a fazem uma espécie em particular. Devido à facilidade de multiplicação em meios de cultura, poderá ser considerada como espécie especial para estudos, principalmente em imunologia, modelos animais e estudos de vacina.^(85,86)

3.4 *Leishmania (Viannia) shawi*

A *Leishmania (Viannia) shawi* foi descrita no macaco-prego (*Cebus apella*), cuxiú (*Chiropotes satanus*), bicho-preguiça (*Choloepus didactylus* e *Bradypus tridactylus*) e no quati (*Nasia nasua*) em 1989. ⁽⁷⁾ Esse trabalho, publicado em 1989, descreve os reservatórios e o seu vetor, *Nyssomyia whitmani*. Tanto o vetor como os reservatórios foram descritos, no estado do Pará, pelo mesmo grupo de pesquisadores que descreveram a *Leishmania lainsoni* e a *Leishmania (V.) naiffi*. A descrição desta nova espécie se deu nos moldes clássicos, determinados pelas características bioquímicas, anticorpo monoclonal, além de características moleculares e sorologia.

A determinação dessa espécie acabou revelando que parte das leishmanioses cutâneas, no Pará, que se considerava como agente etiológico *Leishmania (V.) guyanensis* era,, na realidade, causada por *Leishmania (V.) shawi*. ⁽⁸⁷⁾ Alterações no perfil de zimodemas já indicavam a ocorrência de variabilidade interespecie que acabou sendo parcialmente resolvida na época com a criação do “complexo guyanensis” e as espécies *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) panamensis* e *Leishmania (V.) shawi*. ^(14,88) Posteriormente, outros estudos moleculares puderam contribuir com este padrão de identificação de espécies. ⁽⁸⁹⁻⁹¹⁾

O vetor transmissor dessa espécie de leishmânia, *Nyssomyia whitmani*, apresenta uma ampla distribuição pelo nosso país, desde a região sul até o norte do país. Uma revisão sobre a distribuição desse díptero no

território brasileiro e sua associação com condições geográficas foi estudada por Simone da Costa e publicada em 2007.⁽⁹²⁾

3.5 *Leishmania (Viannia) lindenbergi*

O Instituto Evandro Chagas, em Belém, (PA), identificou, em 1996,⁽⁹³⁾ oito pacientes com diagnóstico de LTA. Todos os pacientes eram soldados que vinham de uma operação de treinamento militar em um mesmo local da região amazônica. Além desses, uma paciente do sexo feminino, moradora de local muito próximo àquele de onde provinham os outros pacientes apresentou também lesão com as mesmas características parasitárias. O agente isolado em cultura de material de lesão desses pacientes diferenciava-se morfologicamente das espécies *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) lainsoni*. Por meio de técnicas imunoenzimáticas o parasito, do subgênero *Viannia*, diferenciou-se de todas as outras espécies conhecidas e recebeu a identificação de *Leishmania (V.) lindenbergi*.

Epidemiologicamente ficou evidente que a inoculação, nos pacientes militares, foi adquirida durante operações noturnas na mata. No caso da paciente de sexo feminino não se identificou a forma de aquisição da doença. Entre os flebotomíneos antropofílicos capturados na área 83,7% eram da espécie *Nyssomyia antunesi*, que é, assim, um provável vetor transmissor dessa nova espécie.

O comportamento em infecção em modelo animal e seu perfil imunoenzimático da *Leishmania (V.) lindenbergi* assemelham-se aos da *Leishmania (V.) naiffi*. Os autores relatam que, após esse estudo, identificaram mais cinco pacientes, todos em condições epidemiológicas similares aos primeiros casos. ⁽⁹³⁾

3.6 *Leishmania (Viannia) guyanensis*

A *Leishmania (Viannia) guyanensis* foi descrita em 1954 por Floch. ⁽⁹⁴⁾ Essa espécie é, há muito tempo, reconhecida como causadora de doença em humanos, principalmente nas regiões da Amazônia situadas na calha norte do rio Amazonas, na Guiana Francesa e em várias regiões dos Estados do Pará e Amazonas. ⁽⁹⁵⁾ Estudo recente de Gustavo Romero demonstrou que essa é a espécie mais prevalente nos arredores de Manaus. ⁽⁹⁶⁾

A história típica da manifestação desta infecção é a aquisição através da entrada do homem no meio da mata ou em seus arredores, em áreas de desmatamento ou garimpo, diferenciando-se da doença causada por outras espécies de leishmânia, como a *Leishmania (V.) braziliensis*. ⁽⁹⁵⁾

No início da década de 80, descreveram-se diversos reservatórios da *Leishmania (V.) guyanensis*: o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), gambá (*Didelphis marsupialis*) e roedor silvestre do gênero *Proechimys*. ⁽⁹⁷⁾

Outro responsável pelo ciclo selvagem da infecção pela *Leishmania (V.) guyanensis* é o bicho preguiça (*Choeloeopus didactylus*), conforme grande estudo que avaliou a infecção em vetores.⁽⁹⁸⁾ O bicho preguiça apresenta grande taxa de infestação e provavelmente é o principal reservatório da espécie na região amazônica.⁽⁹⁹⁾

Além das diferenças de hospedeiros reservatórios, vetores, distribuição geográfica e forma de aquisição, existem diferenças clínicas entre os casos de LC causados *Leishmania (V.) guyanensis* e a *Leishmania (V.) braziliensis*.

As lesões por *Leishmania (V.) guyanensis* são menores e em maior número, provavelmente devido aos hábitos de seu vetor principal *Nyssomyia umbratilis*.⁽³¹⁾ Geralmente as lesões são mais secas, coçam mais e raramente apresentam cheiro peculiar (fétido). Embora possa apresentar casos com linfangite, o acometimento ganglionar é menos frequente, além de acometer mais os membros superiores e o tronco.⁽⁹⁵⁾ Como se não bastassem os aspectos clínicos, a resposta terapêutica ao antimonial pentavalente é também completamente diferente, mostrando-se muito menor na *Leishmania (V.) guyanensis*.⁽⁹⁵⁾

3.7 *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Leishmania (V.) braziliensis Vianna, 1911 pode causar diferentes apresentações da forma cutânea. É a principal espécie causal da forma

mucosa da LTA na América Latina. Está presente em vários países da América Central e do Sul. ⁽¹⁰⁰⁾

Tem presença em ampla área do território brasileiro e é o agente da LC de maior distribuição e prevalência no país, especialmente fora da região amazônica. ⁽¹⁰¹⁾ A transmissão pode dar-se tanto no meio rural como no periurbano.

Seu reservatório é pouco conhecido, mas tem sido observada sua presença em roedores *Proechimys* sp., *Rhipidomys leucodactylus* e *Rattus rattus*; o gambá *Didelphis marsupialis* e o bicho-preguiça *Choloepus didactylus*. ^(78,102)

Tem como vetores conhecidos o *Psychodopygus wellcomei*, no Pará e no Ceará, *Nyssomyia intermedia* nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, e *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia whitmani* e *Pintomyia pessoai* no estado de São Paulo. ⁽¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾

Outra questão que permanece não esclarecida é o papel que alguns animais domésticos como cães, muares e equinos, bem como o próprio homem, poderiam ter na transmissão da *Leishmania (V.) braziliensis* na periferia das grandes cidades. ^(106,107)

3.8 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da LC é realizado pela visualização do agente, que pode ser obtida por pesquisa direta do raspado ou pela

aspiração da borda da lesão, cultivo do parasito, pesquisa de formas amastigotas através de exame anatomopatológico do material de biópsia,⁽¹⁰⁸⁾ técnica de imuno-histoquímica para detecção de antígenos do parasito nas lesões ou de material genômico por técnica moleculares.⁽¹⁰⁹⁾

Além das técnicas descritas acima, outros métodos complementares podem ser realizados. Embora não definam o diagnóstico definitivo da LC, pois as reações sorológicas podem apresentar reações cruzadas com *Trypanosoma*, *Mycobacteria*, *Plasmodium* e *Schistosoma*,⁽¹¹⁰⁾ são úteis como auxílio diagnóstico. São os denominados métodos imunológicos tais como: intradermorreação – reação de Montenegro⁽³⁾ e as reações sorológicas pelos métodos de aglutinação direta (DAT), ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunofluorescência indireta (IFA).^(111,112)

3.9 Amplificação genômica⁽¹¹³⁾

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de amplificação de determinado segmento de DNA, (marcador genético), o que possibilita identificação de agentes infecciosos⁽¹¹⁴⁾ com uma alta sensibilidade.⁽¹¹⁵⁾

Essa técnica possibilita a identificação da espécie ou grupo de espécies do parasito causal em material de biópsia em LTA.

Na identificação de espécies do gênero *Leishmania* há vários marcadores genéticos que podem ser utilizados. No presente estudo, o

material de biópsia de cada paciente foi submetido à identificação de espécie pela análise de dois alvos distintos. Um deles se vale da utilização de um conjunto de iniciadores da reação desenhados a partir do gene de RNA ribossômico, culminando com a determinação da sequência de nucleotídeos de um segmento polimórfico da região que codifica a subunidade menor de rRNA (SSU). Esses polimorfismos refletem a divisão de subgêneros, mas não diferenciam as espécies dentro do subgênero *Leishmania*(*Viannia*), permitindo, no entanto, distinguir *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*) de *Leishmania* (*L.*) *mexicana* e de *Leishmania* (*L.*) *chagasi*, dentro do subgênero *Leishmania* (*Leishmania*). O outro alvo consiste na análise do gene que codifica a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), que apresenta polimorfismos que podem ser explorados na identificação de espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* (*Viannia*), diferenciando assim *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* de outros parasitos pertencentes ao subgênero.

3.10 Técnica de sequenciamento por PCR de SSU – rDNA ⁽²⁵⁾

Por ser uma região gênica muito conservada, a aplicação do PCR utilizando “primers” derivados da sequência SSU resulta na geração do produto (ou PCR positiva) para a presença na amostra de qualquer espécie de leishmânia. As espécies do subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) podem então ser distinguidas pelo sequenciamento do produto de PCR. A análise

sequência permite detectar os nucleotídeos polimórficos e assim diferenciar *Leishmania (L.) amazonensis* de *Leishmania (L.) mexicana* e de *Leishmania (L.) chagasi*. No entanto, as espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania (Viannia)* não apresentam polimorfismo nessa região, não podendo assim ser diferenciadas, apesar de gerarem um produto de PCR. A vantagem desse método é que o resultado da PCR é positivo sempre que o agente estiver presente, independente da espécie a que pertence.

3.11 Técnica de PCR utilizando sequência do gene desidrogenase glicose-6-fosfato (G6PD) ⁽⁹¹⁾

A utilização de um conjunto de “*primers*” desenhados a partir da sequência codificadora da G6PD permite a identificação de polimorfismos dentro das espécies do subgênero *Leishmania (Viannia)*. Dessa forma é possível, só com o resultado desse PCR, diferenciar *Leishmania (Viannia) braziliensis* de outras espécies desse subgênero. (91)

3.12 Preceitos legais e éticos

O presente trabalho utiliza amostras de sangue e de pele provenientes de pacientes inseridos em um protocolo desenvolvido pelo Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e a Secretaria Municipal de Saúde de Santarém. Neste estudo, foi apresentado o termo de consentimento pós-informado, para a autorização da realização de biópsias e coleta de amostras sanguíneas com a finalidade de avaliação laboratorial e sorológica. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias em 18/03/2002 e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq em 29/08/2002. CAPPesq 229/02.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram compilados e analisados os dados clínicos e laboratoriais de 93 pacientes com LC atendidos no CCZS, durante o período compreendido entre janeiro a dezembro do ano de 2003, conforme protocolo conjunto do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP e a Secretaria Municipal de Saúde de Santarém.

Esse protocolo teve o título “*Estudo comparativo entre vinte doses de antimonial pentavalente e três aplicações do isotionato de pentamidina no tratamento da leishmaniose cutânea*”.

O protocolo tinha como objetivo geral, através de estudo prospectivo e aberto, avaliar a eficácia do uso de três doses em dias alternados do isotionato de pentamidina em comparação com o antimonial pentavalente por vinte dias seguidos, e como objetivos específicos:

- observar aspectos quanto à eficácia, aderência ao tratamento e tolerabilidade aos esquemas utilizados;
- identificar espécies de *Leishmania sp* entre os casos de LTA tratados.

Por dificuldades no seguimento dos pacientes submetidos à terapia proposta, os objetivos principais não puderam ser concluídos e as amostras de material de lesões da doença coletadas foram processadas para atender ao segundo objetivo específico que é o escopo deste trabalho.

4.1 Área de estudo

No município de Santarém, estado do Pará, onde foram registrados 263 casos autóctones de LTA no ano 2003, ⁽⁷⁾ os pacientes são diagnosticados e tratados em ambulatório específico situado no CCZS, onde são acompanhados por equipe médica composta por dermatologista e infectologista do convênio entre o Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP e a Secretaria Municipal de Saúde de Santarém.

4.2 Consentimento pós-informado

Todos os pacientes incluídos no estudo, após apresentação de termo de consentimento pós-informado, autorizaram realização da biópsia e coleta de amostras sanguíneas para avaliação laboratorial e sorologia, após receberem explicação sobre a proposta terapêutica, incluindo os possíveis efeitos colaterais de quaisquer medicações e procedimentos incluídos no estudo.

4.3 Critérios de inclusão

Pacientes com diagnóstico confirmado de leishmaniose cutânea localizada única ou múltipla através de positividade a pelo menos um dos critérios:

- exame direto para pesquisa de leishmânia na lesão;
- exame anatomopatológico com visualização de formas amastigotas de leishmânia, e/ou positividade em pesquisa de antígenos de leishmânia pela técnica de imuno-histoquímica no material obtido em biópsia da lesão;
- apresentar positividade em exame de biologia molecular (PCR) para leishmânia.

4.4 Critérios de exclusão

- tratamento para LTA nos últimos seis meses;
- formas clínicas disseminadas e difusas;
- gestantes;
- diabetes melitus, insuficiência renal, insuficiência hepática ou cardiopatia na avaliação inicial.

4.5 Avaliação diagnóstica em todos os pacientes incluídos

A avaliação diagnóstica foi realizada através dos seguintes procedimentos:

- exame direto da escarificação da lesão;
- reação intradérmica de Montenegro;
- reação sorológica para leishmaniose pela técnica de imunofluorescência indireta e ELISA;
- avaliação histopatológica de material obtido por biópsia de lesão cutânea: exame anatomopatológico compatível para LTA e exclusão de outros agentes infecciosos através de coloração específica para pesquisa de bacilo ácido-álcool resistente e fungos;
- imuno-histoquímica específica para leishmânia de material histopatológico;
- PCR para leishmânia a partir de material obtido por biópsia da lesão.

4.6 As amostras

Foram coletadas amostras de sangue e biópsias de lesão de 101 pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea conforme critério de inclusão.

Amostras de dois pacientes foram extraviadas e não foram submetidas a exames. Seis casos foram excluídos por inadequação no processamento das amostras. O total de amostras analisadas, neste trabalho, foi proveniente de 93 pacientes.

4.7 Extração de DNA do material de biópsia

Pequenos fragmentos das lesões foram coletados e mantidos em solução tamponada (NET: NaCl 150 mM, EDTA 50 mM, Tris 100 mM pH 7,5) até o momento da extração de DNA. As amostras foram então lavadas em tampão fosfato (PBS: Na_2HPO_4 7 mM, NaH_2PO_4 26 mM, NaCl 130 mM) e a extração orgânica do DNA foi feita pelo método descrito por Uliana et al. 1991. ⁽¹¹⁶⁾ O material foi mantido a 4°C até o momento do uso nas reações de PCR.

5 REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE (PCRs)

A estratégia utilizada para discriminar as espécies responsáveis pelas infecções baseou-se na presença de DNA do parasita nas amostras. Foram utilizados dois genes-alvos distintos, amplificados por PCR segundo as seguintes etapas:

5.1 PCR com oligonucleotídeos baseada na sequência do gene glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

Todas as amostras foram, como primeiro passo, testadas com prova de PCR baseada na sequência do gene de G6PD que gera produtos específicos capazes de discriminar a espécie *Leishmania (V.) braziliensis* das outras espécies do mesmo subgênero *Leishmania (Viannia)* (Castilho et al. 2004).⁽⁹¹⁾ Um par de oligonucleotídeos específicos para todas as espécies do subgênero *Leishmania (Viannia)* foi utilizado, inicialmente, para gerar o molde de uma segunda PCR (semi-nested) específica para *Leishmania (V.) braziliensis* ou para as outras espécies do subgênero. Por se tratar de um gene de cópia única no genoma do parasito, a técnica de *semi-nested* PCR aumenta substancialmente a sensibilidade do teste.

5.2 PCR com oligonucleotídeos baseada na sequência do gene SSU rDNA (Small Sub-Unit Ribosomal gene)

Sequenciamento por PCR de SSU – rDNA – as amostras negativas na reação anterior foram submetidas a sequenciamento por PCR da região que codifica parte da subunidade menor do RNA ribossômico, conforme descrito em Uliana.⁽¹¹⁷⁾ As reações foram realizadas em solução de 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, gelatina 0,01%, oligonucleotídeos 0,25 µM, deoxinucleotídeo trifosfato 200 µM e Taq polimerase 1,5 U em um volume final de 50 µl de óleo mineral. O DNA foi desnaturado a 94°C por dois minutos e então ciclado por 35 vezes. Os ciclos foram de 94°C por 1 minuto; 55°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0%.

Diferenças pontuais presentes nas sequências específicas amplificadas por essa técnica são capazes de discriminar, dentro do subgênero *Leishmania* (*Leishmania*), as espécies *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* e *Leishmania* (*L.*) *chagasi*, além de discriminar o grupo de parasitos pertencentes ao subgênero *Leishmania* (*Viannia*).⁽¹¹⁷⁾

6 RESULTADOS

Foram analisadas amostras de 93 pacientes, todas submetidas aos dois métodos moleculares propostos.

Pela técnica da PCR da subunidade menor ribossomal, todas as amostras foram positivas para a família Trypanosomatidae. Foto do modelo da reação com controle positivo e negativo é mostrado abaixo:

Figura 3

PCR – SSU rDNA (específico para família Trypanosomatidae)

1 = controle positivo - DNA molde de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

2 = controle positivo - DNA molde de *Crithidia fasciculata*

3 = controle negativo – H₂O

Pela técnica da PCR da subunidade menor ribossomal, todas as amostras foram positivas para o gênero *Leishmania*. Foto do modelo da reação com controle positivo e negativo é mostrado abaixo:

Figura 4

PCR – SSU rDNA (específico para gênero *Leishmania*)

1 = controle positivo - DNA molde de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*

2 = controle negativo - DNA molde de *Crithidia fasciculata*

3 = controle negativo – H₂O

Pela técnica da PCR com oligonucleotídeos baseada na sequência do gene glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), demonstram-se abaixo os controles positivos e negativos específicos para os subgênero *Leishmania* (*Viannia*):

Figura 5

PCR – G6PD (específico para subgênero *Leishmania* (*Viannia*))

1 = controle negativo - DNA molde de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*

2 = controle positivo - DNA molde de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*

3 = controle negativo – H₂O

Pela técnica da PCR com oligonucleotídeos baseada na sequência do gene glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), demonstram-se abaixo os controles positivos para a espécie *Leishmania (V.) braziliensis* e negativo para a espécie *Leishmania (L.) amazonensis*:

Figura 6

PCR – G6PD (específico para espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*)

1 = controle negativo - DNA molde de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

2 = controle positivo - DNA molde de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

3 = controle negativo – H₂O

Pela técnica da PCR com oligonucleotídeos baseada na sequência do gene glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), demonstram-se abaixo os controles negativos para a espécie *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis* e positivo para *Leishmania (V.) guyanensis*:

Figura 7

PCR – G6PD (específico para as espécies *Leishmania (Viannia)* não *braziliensis*)

1 = controle negativo - DNA molde de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

2 = controle negativo - DNA molde de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

3 = controle positivo – DNA molde de *Leishmania (Viannia) guyanensis*

3 = controle negativo – H₂O

6.1 Análise estatística ⁽¹¹⁸⁻¹²⁰⁾

Foram realizados as seguintes apreciações estatísticas, através do Programa SPSS 15.0 for Windows:

- Análise descritiva;
- Comparação dos seguintes parâmetros: idade, tempo de evoluções e número de lesões por sexo e espécie;
- Comparação de municípios e sexo por espécie;
- Comparação da localização das lesões por espécie.

6.1.1 Metodologia

- Para descrição das espécies analisamos resultado de 93 amostras. Foram descartadas oito amostras onde não houve condições de estudo por inexistência (três amostras) e perda de sensibilidade (cinco amostras);
- Um paciente somente teve registro do número de lesão. Assim quando analisados outros parâmetros o número base foi de 92 casos;
- Para análise descritiva foram calculados valores de média, desvio padrão, erro padrão, mínimo, mediana, máximo, frequência e percentual;

- Para comparar idade, tempo de evoluções e número de lesões por sexo e espécie foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA);
- Para comparar municípios e sexo por espécie foi utilizado o teste Qui-Quadrado e o teste Exato de Fisher;
- Foi considerado um nível de significância de 5% (p-valor $\leq$ 0,05).

Tabela 1 – Espécies – frequência e percentual das espécies

Espécie - n (%)	Total
<i>L. (L.) amazonensis</i>	6 (6%)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	53 (57%)
<i>L. (V.)</i> outras espécies	34 (37%)
Total de pacientes	93

Figura 8 – Frequência de espécies encontradas (%)

Em um dos casos, entre os pacientes selecionados, não houve registro de gênero. Desta forma, trabalhamos na variável gênero com 92 casos.

Tabela 2 – Variáveis por sexo

	Gênero		Total
	Feminino	Masculino	
Idade (anos)			
Média ± D.P.	31 ± 8,5	28,3 ± 10,9	28,4 ± 10,7
Erro-padrão	3,8	1,2	1,1
Mediana	32,00	25,00	25,00
Mínimo-Máximo	17 - 39	13 - 77	13 - 77
Total de pacientes	5	86	91
Tempo de evolução			
Média ± D.P.	60 ± 0	68,5 ± 80,4	68,1 ± 78,2
Erro-padrão	0,0	8,6	8,2
Mediana	60,00	60,00	60,00
Mínimo-Máximo	60 - 60	15 - 730	15 - 730
Total de pacientes	5	87	92
Número de lesões			
Média ± D.P.	2 ± 0	1,6 ± 1,4	1,6 ± 1,4
Erro-padrão	0,0	0,1	0,1
Mediana	2,00	1,00	1,00
Mínimo-Máximo	2 - 2	1 - 12	1 – 12
Total de pacientes	5	87	92
Número de lesões - n (%)			
1	0 (0%)	59 (67,8%)	59 (64,1%)
2	5 (100%)	16 (18,4%)	21 (22,8%)
3 ou mais	0 (0%)	12 (13,8%)	12 (13%)
Total de pacientes	5	87	92

6.2 Distribuição dos casos por municípios

Tivemos em cada paciente o provável local de picadura que deu origem ao quadro clínico conforme seu relato verbal. Um dos pacientes não

soube precisá-lo, ficando então sem identificação de local de exposição ao vetor.

Nas tabelas abaixo temos a relação dos locais com as espécies identificadas distribuídas. Consideramos a Guiana Francesa com se fosse um só município.

Tabela 3 – Município – frequência e percentual de casos

Município - n (%)	Total
Alenquer	1 (1,1%)
Altamira	2 (2,2%)
Aveiro	2 (2,2%)
Belterra	9 (9,8%)
Guiana Francesa	4 (4,3%)
Itaituba	4 (4,3%)
Juriti	1 (1,1%)
Manaus	1 (1,1%)
Monte Alegre	2 (2,2%)
Novo progresso	4 (4,3%)
Oriximiná	3 (3,3%)
Placas	2 (2,2%)
Porto de Moz	1 (1,1%)
Rurópolis	3 (3,3%)
Santarém	52 (56,5%)
Uruará	1 (1,1%)
Total de pacientes	92
Município agrupado - n (%)	
Santarém	52 (56,5%)
Outros	40 (43,5%)
Total de pacientes	92

Figura 9 – Distribuição de casos por municípios (%)

Figura 10 – Gráfico de distribuição dos casos por município (%)

6.3 Espécies por municípios

6.3.1 Metodologia

- Para comparar município por espécie foi utilizado o teste Exato de Fisher;
- Foi considerado um nível de significância de 5% ($p\text{-valor} \leq 0,05$).

6.3.2 Resultados

Tabela 4 – Município por espécie

	Espécie			Total
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) outras espécies</i>	
Municípios - n (%)				
Santarém	30 (56,6%)	5 (83,3%)	17 (51,5%)	52 (56,5%)
Outros municípios	23 (43,4%)	1 (16,7%)	16 (48,5%)	40 (43,5%)
Total de pacientes	53	6	33	92

p-valor = 0,3733

Para comparar a distribuição de localização das lesões por espécie foi utilizado o Teste Exato de Fisher. Pelo teste aplicado não há diferença significativa da distribuição de localização das lesões por espécie.

Figura 11 – Distribuição de espécies por municípios (Santarém X outros municípios) (%)

Figura 12 – Mapa da distribuição dos casos

Mapa descritivo dos locais de contaminação dos pacientes analisados neste trabalho
(Google Earth)

Tabela 5 – Idade por espécies

	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) outras espécies</i>	Total
Idade				
Média ± D.P.	30,2 ± 10,5	27,3 ± 9,4	29,9 ± 12,6	28,4 ± 10,7
Erro-padrão	4,3	1,3	2,2	1,1
Mediana	28	24	27	25
Mínimo-Máximo	16 - 43	14 - 66	13 - 77	13 - 77
IC de 95% (LI - LS)	[21,7; 38,6]	[24,7; 29,9]	[25,6; 34,2]	[26,2; 30,6]
Total de pacientes	6	52	33	91

Devido à pequena ocorrência de casos com *Leishmania (L.) amazonensis* para realizar testes estatísticos foi feito o seguinte agrupamento:

- *L. (V.) braziliensis*;
- Outros (todas as outras espécies).

Comparação sexo com espécies

Tabela 6 – Sexo por espécie

	Espécie			Total
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) outras espécies</i>	
Sexo - n (%)				
Feminino	0 (0%)	2 (3,8%)	3 (9,1%)	5 (5,4%)
Masculino	6 (100%)	51 (96,2%)	30 (90,9%)	87 (94,6%)
Total de pacientes	6	53	33	92

Tabela 7 – Sexo por espécies (*L.(V.) braziliensis* X todas outras espécies agrupadas

	Espécie		Total
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Outras	
Sexo - n (%)			
Feminino	2 (3,8%)	3 (7,7%)	5 (5,4%)
Masculino	51 (96,2%)	36 (92,3%)	87 (94,6%)
Total de pacientes	53	39	92

p-valor = 0,6470

Para comparação da distribuição de sexo por espécie foi utilizado o Teste Exato de Fisher. Pelo teste aplicado não há diferença significativa da distribuição de sexo por espécie.

Figura 13 - Distribuição de sexo por espécie (%)

Tabela 8 – Idade por espécie

	Espécie		Total
	L. (V.) braziliensis	Outros	
Idade			
Média ± D.P.	27,3 ± 9,4	29,9 ± 12,2	28,4 ± 10,7
Erro-padrão	1,3	2,0	1,1
Mediana	24	27	25
Mínimo-Máximo	14 - 66	13 - 77	13 - 77
IC de 95% (LI - LS)	[24,7; 29,9]	[26,1; 33,8]	[26,2; 30,6]
Total de pacientes	52	39	91

p-valor = 0,3130

Comparação idade X espécie

Para comparação por espécie utilizou-se o logaritmo da variável idade, pois ela apresentava uma grande variabilidade.

Utilizando a Análise de Variância (ANOVA) obteve-se um p-valor de 0,3130, indicando a não diferença estatística de idade entre as espécies encontradas.

Figura 14 – Idade por espécie – Média e IC de 95%

Tabela 9 – Tempo de evolução em dias de doença por espécie

	Espécie		Total
	L. (V.) braziliensis	Outros	
Tempo de Evolução			
Média ± D.P.	71,6 ± 97,4	63,3 ± 40,2	68,1 ± 78,2
Erro-padrão	13,4	6,4	8,2
Mediana	60	60	60
Mínimo-Máximo	15 - 730	15 - 210	15 – 730
IC de 95% (LI - LS)	[45,4; 97,8]	[50,7; 75,9]	[52,1; 84,1]
Total de pacientes	53	39	92

p-valor = 0,9298

Para comparação por espécie utilizou-se o logaritmo da variável tempo de evolução, pois esta apresentava uma grande variabilidade.

Utilizando a Análise de Variância (ANOVA) obteve-se um p-valor de 0,9298, indicando a não diferença estatística de tempo de evolução entre as espécies encontradas.

Figura 15 – Tempo de evolução por espécie – Média e IC de 95%

Na amostragem, um único paciente apresentou tempo de evolução muito longo, 730 dias. Com a intenção de encontrarmos alguma correlação estatística onde não houvesse um caso único que pudesse interferir indevidamente no resultado, recalculamos os dados de evolução por espécie, excluindo esse caso, e obtivemos:

Tabela 10 – Tempo de evolução em dias por espécie até a data do diagnóstico

	Espécie		Total
	L. (V.) braziliensis	Outros	
Tempo de Evolução			
Média ± D.P.	58,9 ± 31,7	59,4 ± 32,6	59,1 ± 31,9
Erro-padrão	4,4	5,3	3,4
Mediana	60	60	60
Mínimo-Máximo	15 - 150	15 - 150	15 - 150
IC de 95% (LI - LS)	[50,3; 67,5]	[49,1; 69,8]	[52,5; 65,7]
Total de pacientes	52	38	90

p-valor = 0,9864

Para comparação por espécie utilizou-se o logaritmo da variável Tempo de evolução, pois esta apresentava uma grande variabilidade.

Utilizando a Análise de Variância (ANOVA) obteve-se um p-valor de 0,9864, indicando a não diferença estatística de tempo de evolução entre as espécies encontradas.

Figura 16 – Tempo de evolução por espécie – Média e IC de 95%

Tabela 11 – Número de lesões por espécie

	Espécie		Total
	L. (V.) braziliensis	Outros	
Número de lesões			
Média ± D.P.	1,5 ± 0,9	1,8 ± 1,8	1,6 ± 1,4
Erro-padrão	0,1	0,3	0,1
Mediana	1	1	1
Mínimo-Máximo	1 - 5	1 - 12	1 – 12
IC de 95% (LI - LS)	[1,3; 1,7]	[1,2; 2,3]	[1,3; 1,9]
Total de pacientes	53	40	93

p-valor = 0,5673

Para comparação por espécie utilizou-se o logaritmo da variável Número de lesões, pois esta apresentava uma grande variabilidade.

Utilizando a Análise de Variância (ANOVA) obteve-se um p-valor de 0,5673, indicando a não diferença estatística de número de lesões entre as espécies encontradas.

Figura 17 – Número de lesões por espécie – Média e IC de 95%

Como a literatura relata a ocorrência de maior número de lesões nos casos onde *Leishmania (V.) guyanensis* é a espécie causal, tentamos encontrar diferença significativa na comparação do número de lesões comparando as espécies *Leishmania (V.)* outras espécies (onde ocorreria, por suposto, maior participação de *Leishmania (V.) guyanensis*) com *Leishmania (V.) braziliensis*, retirando os casos de *Leishmania (L.) amazonensis*.

Tabela 12 – Número de lesões por espécie (com limite de número de lesões)

	Espécie		Total
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) outras espécies</i>	
Número de lesões			
Média ± D.P.	1,5 ± 0,9	1,7 ± 1,9	1,6 ± 1,4
Erro-padrão	0,1	0,3	0,1
Mediana	1	1	1
Mínimo-Máximo	1 - 5	1 – 12	1 - 12
IC de 95% (LI - LS)	[1,3; 1,7]	[1,1; 2,4]	[1,3; 1,9]
Total de pacientes	53	34	87

p-valor = 0,7332

Para comparação por espécie utilizou-se o logaritmo da variável Número de lesões, pois esta apresentava uma grande variabilidade.

Utilizando a Análise de Variância (ANOVA) obteve-se um p-valor de 0,7332, indicando a não diferença estatística de Número de lesões entre as espécies encontradas.

Figura 18 – Número de lesões por espécie – Média e IC de 95%

Tabela 13 – Número de lesões por espécies agrupadas

	Espécie		Total
	L. (V.) <i>braziliensis</i>	L. (V.) outras espécies	
Número de lesões - n			
(%)			
1	35 (66%)	22 (64,7%)	57 (65,5%)
2	12 (22,6%)	8 (23,5%)	20 (23%)
3 ou mais	6 (11,3%)	4 (11,8%)	10 (11,5%)
Total de pacientes	53	34	87
p-valor = 0,9919			

Para comparação da distribuição de número de lesões por espécie foi utilizado o Teste Qui-Quadrado. Pelo teste aplicado não há diferença significativa da distribuição de número de lesões por espécie.

Figura 19 – Número de lesões por espécie (%)

6.4 Localização das lesões por espécie

6.4.1 Metodologia

- Agrupamos os casos conforme o local da lesão ou lesões em cinco grupos:
 I face
 II membros superiores
 III membros inferiores
 IV tronco
 V lesões em locais distintos

- Para comparação da localização das lesões por espécie foi utilizado o teste Exato de Fisher;
- Foi considerado um nível de significância de 5% (p-valor $\leq$ 0,05).

6.4.2 Resultados

Tabela 14 – Localização das lesões por espécie

	Espécie			Total
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis/ não amazonensis</i>	<i>L. (V.) outras espécies</i>	
Localização das lesões - n (%)				
I (Face)	1 (1,9%)	0 (0%)	1 (3%)	2 (2,2%)
II (Membros superiores)	8 (15,1%)	1 (16,7%)	14 (42,4%)	23 (25%)
III (Membros inferiores)	33 (62,3%)	4 (66,7%)	15 (45,5%)	52 (56,5%)
IV (Tronco)	3 (5,7%)	1 (16,7%)	1 (3%)	5 (5,4%)
V (Locais combinados)	8 (15,1%)	0 (0%)	2 (6,1%)	10 (10,9%)
Total de pacientes	53	6	33	92

p-valor = 0,1117

Para comparação da distribuição de localização das lesões por espécie foi utilizado o Teste Exato de Fisher. Pelo teste aplicado não há diferença significativa da distribuição de localização das lesões por espécie.

Figura 20 – Gráfico de barras – Localização das lesões por espécie (%)

Entretanto, quando comparamos lesões localizadas especificamente em membros superiores e membros inferiores nos casos de *Leishmania (V.) braziliensis* com aquelas causadas por *Leishmania* de outras espécies temos os seguintes números:

Tabela 15 –Localização das lesões por espécie (*L. (L.) braziliensis* X outras espécies

Localização da lesão	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Outras espécies de leishmania	Todos os casos	P
I (Face)	1 (2%)	1 (3%)	2 (2%)	NS
II (Membros superiores)	8 (18%)	15 (41%)	23 (28%)	0,02
III (Membros inferiores)	33 (73%)	19 (51%)	52 (63%)	0,03
IV (Tronco)	3 (7%)	2 (5%)	5 (6%)	NS
V (Locais combinados)	8 (18%)	2 (5%)	10 (12%)	NS
Total de lesões	53 (100%)	39 (100%)	92 (100%)	

7 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado com material coletado de 93 pacientes atendidos no CCZS. Todas as amostras foram submetidas a exames pelas duas técnicas moleculares descritas acima.

A amostra é formada pelo total de pacientes que procuraram o CCZS e que preencheram os critérios de inclusão, independente do local onde se deu a provável exposição aos vetores da doença, ou seja, nossos pacientes são aqueles atendidos no CCZS por procura espontânea ou encaminhados pelo sistema de saúde durante o ano de 2003.

O estudo de material coletado nas condições reais de atendimento de serviços assistenciais de saúde, com as dificuldades que se apresentam na extensa região amazônica, se por um lado pode apresentar lacunas, por outro expressa as condições reais da atenção médica naquela região.

Como a estocagem das amostras coletadas se fez através de conservação em meio líquido tamponado, conforme descrito em “Material e Métodos”, obteve-se a possibilidade de que as amostras fossem encaminhadas para um centro com recursos técnicos com complexidade para análise com maiores recursos técnicos diagnósticos. Há relatos da possibilidade de aplicação de técnicas moleculares em material em parafina que se mostram também eficazes em manter o material estável em ambiente seco e sólido.⁽¹²¹⁾

Como estratégia de identificação dos parasitos causais da LTA utilizamos dois métodos de técnica de biologia molecular que nos

possibilitaram a aplicação do exame em material de biópsia coletado dos pacientes selecionados. Aplicamos duas técnicas laboratoriais, PCR com oligonucleotídeos baseada na sequência do gene G6PD ⁽⁹¹⁾ e PCR de oligonucleotídeos baseada na sequência do gene codificador da subunidade menor ribossômica ⁽¹¹⁷⁾ (SSU-rDNA da expressão em inglês *small sub-unit ribosomal gene*). Ambas as técnicas foram executadas nas amostras no Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos do Departamento de Fisiologia Geral do Instituto de Biociências da USP chefiado pela Professora Lucile Maria Floeter-Winter.

A técnica G6PD nos permite discriminar entre o gênero *Leishmania* (*Viannia*) a espécie *Leishmania* (V.) *braziliensis*. Dessa forma, todas as outras espécies deste gênero que ocorrem na região amazônica, *Leishmania* (V.) *guyanensis*, *Leishmania* (V.) *shawi*, *Leishmania* (V.) *lainsoni*, *Leishmania* (V.) *lindenberghi* e *Leishmania* (V.) *naiffi* não são discriminadas e consequentemente são identificadas como “*Leishmania* (V.) outras espécies”. Com as técnicas moleculares disponíveis neste estudo, não foi possível a discriminação entre as espécies no grupo *Leishmania* (V.) outras espécies. ⁽²⁸⁾

Neste presente trabalho, foi possível discriminar as seguintes espécies de leishmânias: *Leishmania* (L.) *amazonensis*, *Leishmania* (V.) *braziliensis* e *Leishmania* (V.) outras espécies.

7.1 Espécies

Como resultado final, de todas as 93 amostras analisadas tivemos os seguintes números de espécies (tabela 1 e figura 8):

Leishmania (V.) braziliensis em 53 amostras (57%); *Leishmania (L.)* outras espécies em 34 amostras (37%); *Leishmania (L.) amazonensis* em seis amostras (6%).

Esses números demonstram que todas as principais espécies do parasito causal da doença ocorrem na região de Santarém. A espécie *Leishmania (V.) braziliensis* é o agente causal da maioria dos casos estudados. Este número difere dos resultados do trabalho de Jennings que estudou LC na mesorregião do baixo amazonas, ⁽²⁸⁾ bem como de outros que estudam espécies de leishmânia em outras regiões da Amazônia ^(122,123) e que apontam a presença da *Leishmania (V.) guyanensis* como preponderante. ⁽¹²⁴⁾

Leishmania (V.) braziliensis como agente causal de LTA tem vasta distribuição por todo o território brasileiro, ⁽¹²⁵⁾ em especial naqueles locais onde o ambiente natural foi modificado. Trabalhos demonstram a presença desta espécie de leishmânia nos seguintes Estados: Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Rio de Janeiro, Pernambuco e São Paulo. ⁽¹²⁵⁻¹²⁷⁾ É matéria de controvérsia se a espécie *Leishmania (V.) braziliensis* seria autóctone da Amazônia e daí teria se

espraiado para outras regiões através de movimentos migratórios ou se já haveria concomitância dessa espécie na mata atlântica originalmente. ⁽¹²⁸⁾

A expansão da LTA para novas regiões, no Brasil, dá-se com casos cujo agente é *Leishmania (V.) braziliensis* porque o vetor *Nyssomyia intermedia* tem apresentado grande capacidade de adaptação e competitividade substituindo o vetor primitivo dessas regiões, *Nyssomyia Whitmani*, que ocupava originalmente essas áreas. ⁽¹⁰⁶⁾ Na região amazônica a *Leishmania (V.) braziliensis* tem como vetor primordial *Psychodopygus wellcomei* ^(105,129) que é muito antropofílico, com a característica de picar o homem mesmo durante o dia e tem como habitat preferencial as florestas de terra firme. ^(130,131)

O reservatório da *Leishmania (V.) braziliensis* não está definitivamente definido apesar da observação que, em áreas de transmissão da LTA, algumas espécies de animais silvestres, por exemplo *Dasyprocta azarae* (cotia), *Kannabateomys amblyonix* (rato da taquara) e *Cuniculus paca* (paca), bem como alguns roedores dos gêneros *Oryzomys* (rato-de-arroz), *Proechimys* (rato-de-espinho) *Akodon* (rato-do-mato) e mesmo o rato doméstico, têm sido encontrados infectados pelo parasito. ⁽¹⁰⁶⁾ Entretanto, o número de animais observados foi insuficiente para apontar definitivamente qualquer um deles como reservatório epidemiologicamente significativo. ^(105,132)

Por outro lado, a expansão dos casos da LTA para o ambiente periurbano em número cada vez maior de cidades brasileiras dá-se, talvez, pela possível existência de reservatórios peridomiciliares de *Leishmania (V.)*

braziliensis, já que esta espécie tem demonstrado capacidade de adaptar-se a ambientes semimodificados nas cercanias desses municípios.⁽¹³³⁾

Proveniente da cidade de Manaus, local reconhecidamente com predominância de *Leishmania* (V.) *guyanensis*.^(95,125,134) identificamos um paciente com leishmaniose cutânea por *Leishmania* (V.) *braziliensis*. Este fato apresenta importância epidemiológica e clínica, pois está relacionado à possibilidade da presença do vetor dessa espécie naquela região e também à resposta terapêutica com a medicação indicada para o tratamento.^(134,135)

Identificamos 53 amostras (57%) com *Leishmania* (V.) *braziliensis*. Este número difere do resultado do trabalho de Jennings⁽²⁸⁾ onde a autora trabalhou com amostras de biópsia em pacientes procedentes da mesma região, estudando 43 casos no ano de 2001. A referida autora identificou em sua amostra de 43 casos o predomínio de *Leishmania* (V.) *guyanensis*, (46,50%). A diferença do resultado com o presente estudo, provavelmente, está relacionada ao número maior de amostras em nosso trabalho, portanto mais representativo daquele universo.

Tendo em vista a não discriminação pela técnica utilizada neste trabalho entre as espécies do subgênero *Leishmania* (*Viannia*) que não a *Leishmania* (V.) *braziliensis*, agrupamos todas as possíveis outras espécies deste subgênero no que chamamos de *Leishmania* (V.) outras espécies. É esperado que a maior parte deste grupo seja constituída pela espécie *Leishmania* (V.) *guyanensis* tendo em vista que trabalhos apontam a alta prevalência dessa leishmânia na Amazônia.^(95,134,135) Ademais, Jennings demonstrou que tanto *Leishmania* (V.) *shawii* como *Leishmania* (V.) *lainsoni*

tem presença na região do oeste do Estado do Pará, como foi demonstrado em seu trabalho que identificou seis amostras (13,95%) como *Leishmania (V.) lainsoni* e quatro (9,30%) como *Leishmania (V.) shawi* e 20 (46,5%) de *Leishmania (V.) guyanensis*.⁽²⁸⁾

A espécie *Leishmania (V.) guyanensis* é predominante na calha norte da bacia amazônica, com distribuição em vários Estados desta região, como Acre,⁽¹³⁶⁾ Rondônia⁽¹²³⁾ e Amazonas.⁽¹³⁴⁾

Neste trabalho, identificamos apenas seis pacientes com lesão cujo agente causal foi a espécie *Leishmania (L.) amazonensis*. O menor número de casos causado pela *Leishmania (L.) amazonensis* está de acordo com o observado na literatura⁽¹⁰⁶⁾ e com o encontrado por Jennings com amostras da mesma região, oeste do Pará.⁽²⁸⁾ Apesar de amplamente encontrada em animais silvestres esta espécie tem causado menor número de casos em decorrência de seus vetores apresentarem baixa antropofilia e hábitos noturnos.^(137,138) É a única espécie do subgênero *Leishmania (Leishmania)* dermatrópico encontrada na amazônia brasileira.⁽¹³⁹⁾ No Brasil, esta espécie tem sido encontrada no Amazonas, Pará, Maranhão, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul.^(106,140,141)

Do ponto de vista clínico, a importância da espécie *Leishmania (L.) amazonensis* está na sua característica patogênica de causar duas formas clínicas distintas, a LC localizada e a forma anérgica, também denominada cutânea-difusa, apresentação rara dessa espécie⁽³³⁾ encontrada em maior número no estado do Maranhão.⁽¹⁴²⁾

Há carência na literatura de estudos sobre a participação relativa das várias espécies de leishmânias nos casos de LC na região amazônica em trabalhos com números significativos de casos, em especial em espécies menos prevalentes como a *Leishmania (L.) amazonensis*.

A não discriminação entre as espécies do subgênero *Leishmania (Viannia)* que não *Leishmania (V.) braziliensis* é a principal restrição do presente trabalho, já que, como descrevemos acima quando abordamos os aspectos específicos das espécies de leishmânias, cada uma dessas espécies, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmani (V.) shawi*, tem sua epidemiologia distinta, merecendo assim estudos futuros com técnicas que as diferenciem.

7.2 Distribuição dos casos por gênero

Um dos casos, o último paciente da série, não teve registro de gênero anotado. Dessa forma, na análise de distribuição de gêneros, o total de casos estudado foi de 92 pacientes, dos quais 87 eram do sexo masculino e cinco do sexo feminino (tabela 6).

Essa distribuição por gênero, onde a preponderância sempre é de homens entres os casos de LTA, poderia ser explicada pela maior exposição do homem por seu tipo de trabalho. ⁽¹⁰⁶⁾ As profissões onde a preponderância é do sexo masculino teriam maior risco de exposição aos vetores por adentrarem o ambiente silvestre mais do que as pessoas do sexo feminino. ⁽¹⁴³⁾

Por outro lado, há indícios de que a resposta imunológica seja, em grande parte, responsável pela expressão patogênica da doença e que talvez o gênero esteja relacionado à expressão e/ou gravidade da doença. Evidência experimental, em camundongos, demonstrou que animais pré-púberes têm lesões menores e que a doença por leishmânia é menos agressiva em machos; adicionalmente, as fêmeas que receberam testosterona apresentaram maior gravidade da doença, com lesões maiores, provavelmente porque este hormônio masculino aumenta a produção de IL-4 e TGF- β , citocinas que promovem doença mais grave em animais. ⁽¹⁴⁴⁾ Se essa resposta imunológica tem diferença entre os gêneros e, se por um lado, poderia justificar a grande diferença numérica entre eles, por outro, não encontramos trabalhos definitivos na literatura que elucidem a questão, embora haja evidência de agregação familiar de casos de leishmaniose cutânea. ⁽¹⁴⁵⁾

Já há evidência estabelecida de risco geneticamente diferenciado para suscetibilidade de desenvolvimento da doença. Embora a literatura seja limitada, estudo demonstrou suscetibilidade genética para desenvolvimento de LC em grupos populacionais bolivianos diferenciados geneticamente. ⁽¹⁴⁶⁾ Entretanto, permanece a dúvida se a exposição ligada a fatores sociais e/ou de trabalho ou ainda genéticos teriam determinação preponderante.

Em nosso estudo, todos os casos de *Leishmania (L.) amazonensis* foram encontrados em pacientes do sexo masculino. O número de casos é pequeno para a sensibilidade estatística comprovar, mas é significativo que os vetores desta espécie, *Bichromomyia flaviscutellata*, *Bichromomyia*

reducta e *Bichromomyia olmeca nociva* possuam hábitos noturnos e tenham como *habitat* matas mais adensadas. Desta forma, ficam mais expostos madeireiros, garimpeiros e outras profissões que, na Amazônia, são preferencialmente exercidas por pessoas do gênero masculino que têm sua atividade em matas mais adensadas e isoladas.

Embora a *Leishmania* (V.) *braziliensis* tenha sido a espécie mais frequente identificada neste estudo, não houve diferença estatística significativa entre a variável sexo e o agrupamento das outras espécies (tabela 7), fato demonstrado pelo Teste de Fischer ($p=0,6470$). Embora a nossa amostra seja composta por apenas cinco mulheres com LC, outro trabalho, realizado por Romero e colaboradores, também demonstrou não haver diferença entre gêneros quando comparados *Leishmania* (V.) *braziliensis* e *Leishmania* (V.) *guyanensis*.⁽⁹⁵⁾

7.3 Idade

Os pacientes de nosso estudo apresentaram idade que variou entre a mínima de 13 anos e máxima de 77 anos (tabela 8). Idade média de 28,4 anos. Como o número de casos de *Leishmania* (L.) *amazonensis* ocorreu em pequeno número, comparamos a variável idade entre os casos de *Leishmania* (V.) *braziliensis* e todos os outros casos das outras espécies. Entre os casos de *Leishmania* (V.) *braziliensis* a média foi de 27,3 anos e de outras espécies 29,9 anos com um $p=0,3130$. Assim, na nossa amostra, não

há evidência estatística de diferença na variável idade entre as espécies estudadas.

A idade média encontrada está de acordo com o que se observa em outros trabalhos brasileiros onde a faixa etária predominante é sempre de adultos jovens entre 20 a 30 anos de vida. ^(141,147-149)

7.4 Município de contaminação

O provável local de contaminação, conforme relatado pelos pacientes, ocorreu em 16 municípios (tabela 3 e figura 9). Com exceção do município de Manaus, no Amazonas, (um paciente) e de localidades na Guiana Francesa (quatro pacientes) todos os enfermos atendidos relataram terem se contaminado em Santarém ou em município próximo, em um raio de até 357 km de distância dessa cidade.

Como os casos provenientes de outros municípios fora de Santarém distribuem-se de maneira esparsa entre os vários locais e apresentam pequeno número de pacientes (Figura 9), agrupamos todos os casos daqueles que não foram contaminados em Santarém em um só grupo e o comparamos com o grupo de pacientes contaminados em Santarém (figura 10).

A maioria dos pacientes relatou local de contaminação no município de Santarém (56,5%). Somente um paciente não soube discriminar o possível local de exposição.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos casos do Município de Santarém e o agrupamento de outros municípios em relação às espécies *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.)* outras espécies e *Leishmania (L.) amazonensis* (tabela 4). Este fato provavelmente decorre da participação similar dessas espécies nos municípios avaliados.

Ressaltamos que dos seis casos identificados de *Leishmania (L.) amazonensis* cinco são provenientes do município de Santarém e um do município Belterra que é contíguo a Santarém. Tendo em vista o tamanho pequeno da amostra de casos com *Leishmania (L.) amazonensis*, não podemos fazer ilações sobre o significado da diferença de distribuição dessa espécie nos dois grupos de municípios.

7.5 Tempo de evolução por espécie

O tempo de evolução da doença foi aquele descrito na história clínica de cada paciente. Compreende o período que vai do início da lesão até o diagnóstico realizado no CCZS, conforme relatado, sendo assim uma variável dependente da auto-observação ou constatada pelo responsável pelo paciente. No conjunto de nossa amostra essa variável apresentou um mínimo de 15 dias e um máximo de 730 dias (tabela 9). A média e o desvio padrão do tempo de evolução nos casos causados pela espécie *Leishmania (V.) braziliensis* foi de $71,6 \pm 97,4$ dias. Nos casos causados pelo conjunto de

outras espécies foi de $63,3 \pm 40,2$ dias. Obtivemos um p-valor de 0,9298 que demonstra que o resultado não foi estatisticamente significativo.

Como apenas um caso, causado por *Leishmania (V.) braziliensis*, apresentava uma evolução de 730 dias, tentamos observar se haveria maior significância se analisássemos a variável sem esse caso. O resultado com essa exclusão aproximou a média entre os dois grupos, mas manteve a não significância estatística dos números encontrados (tabela 10).

Das espécies identificadas neste estudo, a *Leishmania (V.) braziliensis* foi a mais frequentemente encontrada. O conhecimento sobre a evolução de seu quadro clínico é certamente o mais estudado, provavelmente porque esta espécie é a principal causadora da forma mucosa da LTA, bem como a espécie mais abundante nas várias regiões do país. Sabe-se que as lesões cutâneas da *Leishmania (V.) braziliensis* podem apresentar cicatrização espontânea, sendo que 50% das úlceras apresentam resolução em seis meses e 80% em um ano.⁽¹⁵⁰⁾ É importante destacar que em alguns pacientes a cicatrização espontânea pode não ocorrer, ou pode ser extremamente demorada, como exemplificado neste trabalho, onde um paciente procurou atendimento após 730 dias de lesão ativa. A LC causada pela *Leishmania (V.) braziliensis* não tratada adequadamente com medicação específica tem maior risco de evolução para acometimento mucoso, fato que reforça mais uma vez a importância do encontro expressivo, neste trabalho, desta espécie, na região de Santarém.⁽¹⁵⁰⁾

7.6 Número de lesões por espécie

Há descrição de que os casos LC causados por *Leishmania (V.) guyanensis* apresentam, em média, maior número de lesões quando comparados com aqueles causados por *Leishmania (V.) braziliensis*.⁽⁹⁵⁾ Estudo anterior evidenciou que o número de lesões entre 22 pacientes com *Leishmania (V.) braziliensis* era bastante semelhante aos nossos resultados. Neste referido trabalho encontrou-se de uma a quatro lesões⁽⁹⁵⁾ para esta espécie, enquanto que, em nosso estudo, detectamos de uma a cinco. Quanto a *Leishmania (V.) guyanensis*, no estudo descrito acima, o número de lesões variou de um a seis.⁽⁹⁵⁾

Como a espécie *Leishmania (V.) guyanensis*, neste nosso trabalho, está incluída no grupo de *Leishmania (V.)* outras espécies foi realizado teste estatístico entre este grupo e *Leishmania (V.) braziliensis*, mas o resultado não foi estatisticamente significativo, $p=0,7332$ (Tabela 12).

Embora em nossa amostra não tenha sido detectada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre o número de lesões nos casos onde o agente foi *Leishmania (V.) braziliensis* com aqueles causados por todas as outras espécies, podemos observar que na Tabela 12, o número de lesões é discretamente maior para outras espécies do que para *Leishmania (V.) braziliensis*, o que reforça a hipótese que dentro do grupo de *Leishmania*

(V.) outras espécies a *Leishmania* (V.) *guyanensis* esteja presente e, desta forma, o número de lesões seja maior.

7.7 Local de lesão

Comparamos o local de lesão cutânea por espécie conforme se situasse em:

- I. Face
- II. Membros superiores
- III. Membros inferiores
- IV. Tronco
- V. Misto

Encontramos maior presença de lesões localizadas em membros inferiores em todos os grupos: *Leishmania* (V.) *braziliensis* 62% das lesões; *Leishmania* (L.) *amazonensis* 67%; *Leishmania* (V.) outras espécies 45% (tabela 14). A predominância de lesões em membros inferiores está de acordo com o achado em trabalho anterior que compara aspectos clínicos das lesões em LC causadas por *Leishmania* (V.) *braziliensis* com aquelas causadas por *Leishmania* (V.) *guyanensis*; ⁽⁹⁵⁾ este estudo constatou maior comprometimento de membros inferiores nos casos causados por *Leishmania* (V.) *braziliensis* do que naqueles causados por *Leishmania* (V.) *guyanensis*. ⁽⁹⁵⁾

Já em casos causados por *Leishmania (L.) amazonensis* o acometimento preferencial de partes superiores do corpo foi relatado em estudo realizado em Mato Grosso do Sul, onde os pacientes eram militares em treinamento na selva. Talvez isto se deva à forma de exposição decorrente da atividade de exercício de manobra militar. ⁽¹⁴¹⁾ Em nossa amostra houve predomínio de membros inferiores também nos casos de *Leishmania (L.) amazonensis*.

A localização da lesão pode ser decorrente de fatores relacionados tanto à variabilidade das atividades relacionadas ao hospedeiro humano quanto às características do vetor. Estudo realizado no Peru demonstrou que nas regiões mais frias deste país, localizadas ao Sul, havia predomínio de lesões de LC especialmente na cabeça e, em regiões mais quentes, ao norte do país, as lesões eram mais frequentes nas extremidades. Fatores climáticos podem ser, talvez, os responsáveis até mesmo pelo tamanho das lesões, pois alteram a velocidade de crescimento da leishmânia ou mesmo o aparecimento de infecções bacterianas associadas. ⁽¹⁵¹⁾

Neste estudo, talvez em decorrência de não haver grandes alterações climáticas na região de proveniência dos nossos pacientes estudados, como aquelas que ocorrem no Peru, local onde aquele trabalho ⁽¹⁵¹⁾ foi realizado, encontramos predomínio de lesões em membros inferiores, independente da espécie de leishmânia causal, o que provavelmente reforça a hipótese do comportamento vetorial e humano explicar o encontro das lesões predominantemente em extremidades.

Entretanto, quando comparamos a localização das lesões de LC em membros inferiores com membros superiores causadas por *Leishmania (V.) braziliensis* com aquelas causadas por todas as outras espécies (Tabela 15), constatamos preferência por membros inferiores nos casos de *Leishmania (V.) braziliensis*, com significância estatística ($p=0,03$).

7.8 Observação final

As doenças negligenciadas acometem milhares de pessoas em todo o mundo, mas não dispõem de medicamentos eficazes. São elas: a doença de Chagas, leishmanioses, doença do sono e malária. Por acometerem uma população de baixo poder aquisitivo, despertam pouco interesse da indústria farmacêutica na produção de medicamentos específicos. É preocupante a constatação que, nos últimos 30 anos, foram registrados 1535 medicamentos para todas as outras doenças e apenas 18 fármacos para as doenças negligenciadas e três para tuberculose⁽¹⁵²⁾. Nos países ricos a expectativa de vida e os avanços científicos foram significantes, mas, nas nações em desenvolvimento, as doenças negligenciadas continuam a assolar as populações pobres, estimadas em mais de 500 milhões de pessoas sujeitas a contrair doença do sono, leishmaniose e doença de Chagas.

Políticas públicas com investimentos em financiamentos em pesquisas em Universidades públicas ou privadas são importantes para promover avanços no tratamento e controle das doenças negligenciadas. No

Brasil, como fato positivo, temos a introdução nos protocolos oficiais de tratamento de medicamentos menos tóxicos do que o antigo antimonial pentavalente e mais eficazes para o tratamento das leishmanioses, especialmente as formulações lipídicas da anfotericina B. ⁽¹⁵²⁾

O mapeamento das espécies causadores de LTA ainda é bastante incipiente no país, o que dificulta a solução de problemas em relação ao diagnóstico e, especialmente, aqueles relacionados ao tratamento, visto que espécies diferentes respondem à terapêutica de forma distinta. A mesma espécie, em diferentes regiões geográficas, pode apresentar uma resposta diferente ao tratamento, conforme a dose e a escolha do medicamento a ser utilizado. ⁽¹⁵³⁾

Leishmania (V.) braziliensis é conhecida como a principal espécie causal da leishmaniose mucosa, ^(154,155) embora haja relatos de que tanto as espécies de *Leishmania (V.) amazonensis* ⁽⁵¹⁾ como *Leishmania (V.) guyanensis* ⁽¹⁵⁶⁾ possam, eventualmente, causar esta apresentação da leishmaniose. Nos casos de LTA causados por *Leishmania (V.) braziliensis* observa-se mais insucesso do tratamento convencional ⁽¹⁵⁷⁾ tanto na sua forma cutânea como mucosa, ^(158,159) bem como mais recidiva. ⁽¹⁶⁰⁾ A constatação, neste trabalho, da grande participação da *Leishmania (V.) braziliensis* como principal agente da LC na região do município de Santarém, tem implicações na necessidade de alternativas ao uso do antimoniato de N-metil glucamina ^(11,161) como principal fármaco de indicação de tratamento da LC nessa região. ⁽¹³⁵⁾

O presente estudo contribui para a identificação das espécies causais de LC na mesorregião do baixo Amazonas. Identificar agentes causais de LC não se restringe ao interesse puramente acadêmico, mas é uma necessidade permanente para melhoria da prática clínica efetiva.⁽¹⁶²⁾ A região amazônica não é um ecossistema inerte. Há uma dinâmica ecológica em permanente transformação, o que nos leva a considerar que a epidemiologia das LC também está em constante mudança.

8 CONCLUSÕES

1. As técnicas de identificação genômica, PCR com oligonucleotídeos baseada na sequência do gene G6PD e PCR com oligonucleotídeos baseada na sequência do gene SSU rDNA, são úteis na identificação de espécies em material de biópsia conservado em meio tamponado e analisados a longa distância.
2. *Leishmania (V.) braziliensis* é a espécie mais frequente entre os casos de leishmaniose cutânea dos pacientes atendidos no CCZS.
3. Em LC de pacientes atendidos no CCZS foram identificadas as seguintes espécies: *Leishmania (V.) braziliensis*, em 57% dos casos, *Leishmania (L.) amazonensis*, em 6% dos casos e *Leishmania (V.)* outras espécies em 37% dos casos.

4. Encontramos maior ocorrência de lesões em membros inferiores nos casos de LC causados por *Leishmania (V.) braziliensis* comparado com os casos de outras espécies de leishmânias.
5. Não houve diferença significativa no número de lesões nos casos causados por *Leishmania (V.) braziliensis* e o grupo de *Leishmania (V.)* outras espécies.
6. Não houve diferença estatística significativa na ocorrência das espécies de leishmânias estudadas e idade dos pacientes
7. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a ocorrência de *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.)* outras espécies no do Município de Santarém quando comparado com o conjunto dos outros municípios.

9 REFERÊNCIAS

1. Camargo EP. Doenças Tropicais. *Estudos Avançados - USP*. 2008;22:95-110.
2. Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica*. 1994;10:359-75.
3. Ramos ESM, De Moura Castro Jacques C. Leishmaniasis and other dermatozoonoses in Brazil. *Clin Dermatol*. 2002;20:122-34.
4. Pirmez C, Coutinho SG, Marzochi MC, Nunes MP, Grimaldi G, Jr. Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;38:52-8.
5. Tolezano JE. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994;89:427-34.
6. Amato VS, Boulos MI, Amato Neto V, Filomeno LT. The use of a silicone T tube for the treatment of a case of American mucocutaneous leishmaniasis with tracheomalacia. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1995;28:129-30.
7. Ministério da Saúde. Sistema de Notificação de Agravos de Notificação - SINAN. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb>. Acesso em 13 maio 2009.
8. Amazonas TMM, Oliveira NT. Informações Municipais. In: *Planejamento Santarém. Prefeitura Municipal de Santarém; 2008*.
9. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades@ Disponível em: www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm. Acesso em 26 junho 2007.

10. Prefeitura Municipal de Santarém: *Aspectos econômicos*. Disponível em www.santarem.pa.gov.br/home. Acesso em 17 maio 2009.
11. Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:266-74.
12. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99:239-51.
13. Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G, Jr. Genetic diversity in natural populations of New World Leishmania. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998;93:663-8.
14. Cupolillo E, Grimaldi G, Jr., Momen H. A general classification of New World Leishmania using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;50:296-311.
15. Tuon FF, Neto VA, Amato VS. Leishmania: origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008;54:158-66.
16. FUNASA. Vigilância e monitoramento da leishmaniose tegumentar americana em unidades territoriais - Brasil, 1994-2001. *Boletim Epidemiológico Eletrônico*. 2002;5:1-7.
17. Rotureau B. Ecology of the leishmania species in the Guianan ecoregion complex. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74:81-96.
18. Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica. *Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo Casos Notificados por GVE e Ano da Notificação — 1998 a 2009* Disponível em www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lta_gve.htm. Acesso em 03 maio 2009.
19. Rotureau B. Trypanosomatid (Protozoa, Kinetoplastida) parasites of sloths (Mammalia, Xenarthra). *Bull Soc Pathol Exot*. 2006;99:171-5.

20. Jeronimo SMB, Sousa AQ, Pearson RD. Leishmanias species. In Mandell, Bennett & Dollin. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6ª ed. New York: Churchill Livingstone; 2005. Disponível em www.mdconsult.com. Acesso em 03 maio 2007.
21. Falqueto A, Sessa PA. Leishmaniose Tegumentar Americana. In Veronesi - Focaccia R. editor. *Tratado de Infectologia*. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005;1543-57.
22. Grimaldi G, Jr., Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*. 1993;6:230-50.
23. Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degraeve WM, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic Leishmania species. *Mol Biochem Parasitol*. 1994;66:261-71.
24. Degraeve 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*. 1994;89:463-9.
25. Floeter-Winter LM, Shaw JJ. New horizons in the identification and taxonomy of the Leishmania and the diagnosis of the leishmaniasis: the expansion of molecular techniques. *Res Adv in Microbiology*. 2004;4:63-79.
26. Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC. Mucosal leishmaniasis .Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop*. 2008;105:1-9.
27. Lainson R, Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature*. 1978;273:595-600.
28. Jennings YLL. Caracterização isoenzimática e por anticorpos monoclonais dos agentes da leishmaniose tegumentar americana (LTA) na mesorregião do baixo amazonas, Estado do Pará, Brasil. Belém: *Universidade Federal do Pará*; 2003.

29. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília; 2007.
30. Ministério da Saúde. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana diagnóstico clínico e diferencial. Brasília; 2005:25-6.
31. Pajot FX, Le Pont F, Gentile B, Besnard R. Epidemiology of leishmaniasis in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982;76:112-3.
32. Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:239-51.
33. Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100:525-34.
34. Colmenares M, Constant SL, Kima PE, McMahon-Pratt D. *Leishmania pifanoi* Pathogenesis: Selective Lack of a Local Cutaneous Response in the Absence of Circulating Antibody. *Infect Immun.* 2002;70:6597-605.
35. Magill AJ, Grogl M, Gasser RA, Sun W, Oster CN. Visceral Infection Caused by *Leishmania tropica* in Veterans of Operation Desert Storm. *N Engl J Med.* 1993;328:1383-7.
36. Akuffo H, Maasho K, Blostedt M, Hojeberg B, Britton S, Bakhiet M. *Leishmania aethiopica* derived from diffuse leishmaniasis patients preferentially induce mRNA for interleukin-10 while those from localized leishmaniasis patients induce interferon-gamma. *J Infect Dis.* 1997;175:737-41.
37. Calvopina M, Uezato H, Gomez EA, Korenaga M, Nonaka S, Hashiguchi Y. Leishmaniasis recidiva cutis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in subtropical Ecuador: isoenzymatic characterization. *Int J Dermatol.* 2006;45:116-20.

38. Coura JR, Galvao-Castro B, Grimaldi Junior G. Disseminated American cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987;82:581-2.
39. Machado ES, Braga Mda P, Da Cruz AM, Coutinho SG, Vieira AR, Rutowitsch MS, et al. Disseminated American muco-cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis* in a patient with AIDS: a case report. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87:487-92.
40. Hernandez DE, Oliver M, Martinez C, Planas G. Visceral leishmaniasis with cutaneous and rectal dissemination due to *Leishmania braziliensis* in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Int J Dermatol*. 1995;34:114-5.
41. Hernandez DE, Rodriguez N, Wessolossky M, Convit J. Visceral leishmaniasis due to a *Leishmania* variant that shares kinetoplast DNA sequences with *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana* in a patient infected with human immunodeficiency virus: identification of the *Leishmania* species with use of the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis*. 1995;21:701-2.
42. Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10:298-319.
43. Borges AS, Machado AA, Ferreira MS, de Castro Figueiredo JF, Silva GF, Cimerman S, et al. Concurrent leishmaniasis and human immunodeficiency virus (HIV) infection: a study of four cases. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32:713-9.
44. Rabello A, Orsini M, Disch J. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003;97 Suppl 1:17-28.
45. Couppie P, Clyti E, Sobesky M, Bissuel F, Del Giudice P, Sainte-Marie D, et al. Comparative study of cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients and non-HIV-infected patients in French Guiana. *Br J Dermatol*. 2004;151:1165-71.

46. Lindoso JA, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MI, Oyafuso LK, Amato VS, et al. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol*. 2009;160:311-8.
47. Da-Cruz AM. *Experiência da Rede Brasileira de Co-infecção Leishmania-HIV*. Aula no XIV Congresso Panamericano de Infectologia;23/04/2009; Campos de Jordão.
48. Ministério da Saúde - Programa Nacional DST/AIDS. Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção Leishmania-HIV. Brasília: Editora MS; 2004. p. 18.
49. Grimaldi G, Jr., Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barrett TV. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;44:645-61.
50. Lainson R, Shaw JJ. Leishmania (Viannia) naiffi sp. n., a parasite of the armadillo, Dasypus novemcinctus (L.) in: *Amazonian Brazil*. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1989;64:3-9.
51. Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi G, Jr., Momen H, McMahon-Pratt D, de Jesus AR, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that Leishmania amazonensis Produces a Wide Spectrum of Clinical Disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;44:536-46.
52. Ministério da Saúde Fundação Nacional de Saúde. *Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília; 2000.
53. Greig SR, Akinsehinwa FA, Ashall F, Lainson R, Shaw JJ, Miles MA, et al. The feasibility of discrimination between Leishmania and Endotrypanum using total parasite DNA probes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1989;83:196.
54. Hanham CA, Shaw JJ, Lainson R. Monoclonal antibodies that react with Leishmania (Viannia) naiffi. *J Parasitol*. 1991;77:680-7.
55. Naiff RD, Freitas RA, Naiff MF, Arias JR, Barrett TV, Momen H, et al. Epidemiological and nosological aspects of Leishmania naiffi Lainson & Shaw, 1989. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;86:317-21.

56. Le Pont F. [Attraction of the armadillo (*Dasypus novemcinctus*, L.) and guinea pigs for phlebotomines in French Guiana]. *Bull Soc Pathol Exot.* 1990;83:671-6.
57. Gonzalez R, Devera R. [Sand-fly fauna (Diptera, psychodidae, phlebotominae) in Bolivar State, Venezuela]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32:721-3.
58. Freitas RA, Naiff RD, Barrett TV. Species diversity and flagellate infections in the sand fly fauna near Porto Grande, State of Amapa, Brazil (Diptera: Psychodidae. Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:53-9.
59. Fouque F, Gaborit P, Issaly J, Carinci R, Gantier JC, Ravel C, et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with changing patterns in the transmission of the human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:35-40.
60. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Garcez LM, Souza AA, Braga RR, et al. Experimental skin leishmaniasis: II--course of the infection in the *Cebus apella* primate (Cebidae) caused by *Leishmania* (V.) *braziliensis* and *L. (L.) amazonensis*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1990;23:5-12.
61. Darie H, Deniau M, Pratlong F, Lanotte G, Talarmin A, Millet P, et al. Cutaneous leishmaniasis of humans due to *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* outside Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995;89:476-7.
62. Pratlong F, Deniau M, Darie H, Eichenlaub S, Proll S, Garrabe E, et al. Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania naiffi* is widespread in South America. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002;96:781-5.
63. Tojal da Silva AC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GA. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health.* 2006;11:1388-98.
64. Gil LH, Basano SA, Souza AA, Silva MG, Barata I, Ishikawa EA, et al. Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of

- the State of Rondonia, Western Amazonia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisi* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:751-5.
65. Silveira FT, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa E. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* sp.n., a new parasite from the State of Para. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987;82:289-91.
 66. Cupolillo E, Grimaldi Junior G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 1995;73:145-55.
 67. Hanham CA, Zhao FS, Shaw JJ, Lainson R. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1991;85:220.
 68. Fernandez O, Pacheco R, Momen H, Degraeve W, Campbell DA. *Leishmania lainsoni*: a peculiar *Viannia* species. *Ann Trop Med Parasitol*. 1995;89:81-2.
 69. Correa JR, Brazil RP, Soares MJ. *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* subgenus--a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:587-92.
 70. McCann SH, Eresh S, Barker DC. Kinetoplast minicircle DNA from *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*. *Parasitology*. 1999;118:371-4.
 71. Eresh S, de Bruijn MH, Mendoza-Leon JA, Barker DC. *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* occupies a unique niche within the subgenus *Viannia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1995;89:231-6.
 72. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Garcez LM, Souza AA, Braga RR, et al. Experimental cutaneous leishmaniasis: I--on the susceptibility of the primate *Cebus apella* (Cebidae) to the infection caused by *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* Silveira, Shaw and Ishikawa, 1987. *Rev Soc Bras Med Tropical*. 1989;22:125-30.

73. Silveira FT, Moraes MA, Lainson R, Shaw JJ. Experimental cutaneous leishmaniasis. III. Histopathological aspects of the developmental behavior of the cutaneous lesion induced in *Cebus apella* (Primates: Cebidae) by *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*, L. (V.) *braziliensis* and L. (*Leishmania*) *amazonensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1990;32:387-94.
74. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Ishikawa EA, Souza AA, Braga RR. [Sensitivity of the culture of circulating leukocytes in the detection of *Leishmania* in the peripheral blood of patients with tegumentary leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Tropical*. 1989;22:143-6.
75. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, De Souza AA, Ishikawa EA, Braga RR. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1991;85:735-8.
76. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EE, Souza AA. [Cutaneous leishmaniasis in Amazonia: isolation of *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* from the rodent *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae), in the state of Para, Brazil]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1991;33:18-22.
77. Lainson R, Shaw JJ, Souza AA, Silveira FT, Falqueto A. Further observations on *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae), the sandfly vector of *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87:437-9.
78. Shaw JJ, Lainson R, Ryan L, Braga RR, McMahon-Pratt D, David JR. Leishmaniasis in Brazil: XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis braziliensis* in wild-caught neotropical sandflies using monoclonal antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81:69-72.
79. Ryan L, Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Para State, with particular reference to the role of *Psychodopygus wellcomei* as the

- vector of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the Serra dos Carajas. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81:353-9.
80. Bastrenta B, Buitrago R, Vargas F, Le Pont F, Torrez M, Flores M, et al. First evidence of transmission of *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* in a Sub Andean region of Bolivia. *Acta Trop.* 2002;83:249-53.
 81. Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Carrizales D, Kreutzer RD. *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*: first isolation in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51:533-7.
 82. Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Cruz ME, Kreutzer RD, et al. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59:312-7.
 83. Martinez E, Le Pont F, Mollinedo S, Cupolillo E. A first case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* in Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95:375-7.
 84. Kreutzer RD, Corredor A, Grimaldi G, Jr., Grogl M, Rowton ED, Young DG, et al. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;44:662-75.
 85. Correa JR, Soares MJ. *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*: occurrence of intracellular promastigote forms in vivo and in vitro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 Dec;101(8):923-4.
 86. Correa JR, Santos SG, Araujo MS, Baptista C, Soares MJ, Brazil RP. Axenic promastigote forms of *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* as an alternative source for *Leishmania* antigen production. *J Parasitol.* 2005;91:551-6.
 87. Shaw JJ, Ishikawa EA, Lainson R, Braga RR, Silveira FT. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* Lainson, de Souza, Pova, Ishikawa & Silveira, in Para State, Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1991;66:243-6.

88. Ishikawa EA, Silveira FT, Magalhaes AL, Guerra junior RB, Melo MN, Gomes R, et al. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96 (Suppl 1):S111-21.
89. Mendoza-Leon A, Luis L, Fernandes O, Cupolillo E, Garcia L. Molecular markers for species identification in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96 (Suppl 1):S65-70.
90. Luis L, Ramirez AH, Ramirez R, Velez ID, Mendoza-Leon A. Nuclear DNA sequence specific to *Leishmania* (*Viannia*) subgenus: a molecular marker for species identification. *Parasitology.* 2001;122:405-14.
91. Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J Clin Microbiol.* 2003;41:540-6.
92. da Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939)(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil--mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:149-53.
93. Silveira FT, Ishikawa EA, De Souza AA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belem, Para State, Brazil, caused by *Leishmania* (*Viannia*) *lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite.* 2002;9:43-50.
94. Floch H. *Leishmania tropica guyanensis* n. ssp., cause of cutaneous leishmaniasis in the Guianas and Central America. *Publ Inst Pasteur Guyane Fr Inini.* 1954;15:1-4.
95. Romero GA, Vinitius De Farias Guerra M, Gomes Paes M, de Oliveira Macedo V. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. *Clin Infect Dis.* 2001;32:1304-12.
96. Romero GA, Ishikawa E, Cupolillo E, Toaldo CB, Guerra MV, Paes MG, et al. Identification of antigenically distinct populations of *Leishmania*

- (Viannia) guyanensis from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. *Acta Trop.* 2002;82:25-9.
97. Arias JR, Naif RD, Miles MA, de Souza AA. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981;75:537-41.
 98. Christensen HA, Arias JR, de Vasquez AM, de Freitas RA. Hosts of sandfly vectors of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the central Amazon of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1982;31:239-42.
 99. Lainson R, Shaw JJ, Pova M. The importance of edentates (sloths and anteaters) as primary reservoirs of *Leishmania braziliensis guyanensis*, causative agent of "pianbois" in north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981;75:611-2.
 100. Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 1996;22:1-13.
 101. Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira AL, et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58:824-7.
 102. Brandao-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97:291-6.
 103. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, de Souza AA, Braga RR, Ishikawa EA. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994;89:435-43.

104. Lainson R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1988;321:389-404.
105. Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983;77:569-96.
106. Marzochi MC, Marzochi KBF, Schubach A. Leishmaniose tegumentar americana. In: Benjamin Cimerman SC, editor. *Parasitologia Humana*. São Paulo: Editora Atheneu; 1999. p. 39-64.
107. Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61:530-41.
108. Cuba CA, Marsden PD, Barreto AC, Rocha R, Sampaio RR, Patzlaff L. Parasitologic and immunologic diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1980;89:195-208.
109. Castilho TM, Camargo LM, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78:122-32.
110. Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol.* 1995;21:123-52.
111. Mauro Celio de Almeida Marzochi; Armando de Oliveira Schubach KBFM. *Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais*. São Paulo: Atheneu; 1999. p. 39-64.
112. Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol.* 1996;34(2 Pt 1):257-72.
113. Hayden R, Persing DH. Diagnostic molecular microbiology. *Curr Clin Top Infect Dis.* 2001;21:323-48.

114. Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 1999;29:475-86.
115. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med*. 1990;322:178-83.
116. Uliana SR, Affonso MH, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Leishmania: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. *Exp Parasitol*. 1991;72:157-63.
117. Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Discrimination amongst Leishmania by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 1994;41:324-30.
118. Fleiss JL, editor. *Statistical methods for rates and proportions*. 3^a ed. New York: John Wiley & Sons;2003.
119. Martins JLFGA. *Curso de Estatística*. 3^a edição ed. São Paulo: Atlas; 1982.
120. Montgomery DC. *Design and analysis of experiments*. New York: John Wiley & Sons;2001.
121. Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR detection and identification of Leishmania parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol*. 1999;85:181-7.
122. Barbosa MGV, Fé NF, Marcião AHR, Silva APT, Monteiro WM, Guerra JAO. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de leishmaniose tegumentar americana na área periurbana de Manaus, Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41:485-91.
123. Shaw JJ, De Faria DL, Basano SA, Corbett CE, Rodrigues CJ, Ishikawa EA, et al. The aetiological agents of American cutaneous leishmaniasis

- in the municipality of Monte Negro, Rondonia state, western Amazonia, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol*. 2007;101:681-8.
124. Guerra JAO, Talhari S, Paes MG, Garrido M, Talhari JM. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36:587-90.
 125. Grimaldi G, Jr., David JR, McMahon-Pratt D. Identification and distribution of New World Leishmania species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg*. 1987;36:270-87.
 126. Andrade MS, Brito ME, Silva ST, Lima BS, Almeida EL, Albuquerque EL, et al. American tegumentary leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) braziliensis in military training area of Zona da Mata in Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38:229-33.
 127. Passos NP. *Avaliação da reação em cadeia de polimerase (PCR) no diagnóstico da leishmaniose cutânea no Estado do Espírito Santo, Brasil*. São Paulo: USP; 2003.
 128. Andrade MS, Valenca HF, da Silva AL, Almeida Fde A, Almeida EL, de Brito ME, et al. Sandfly fauna in a military training area endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2005;21:1761-7.
 129. Ready PD, Ribeiro AL, Lainson R, de Alencar JE, Shaw JJ. Presence of Psychodopygus wellcomei (Diptera: Psychodidae), a proven vector of Leishmania braziliensis braziliensis, in Ceara State. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1983;78:235-6.
 130. R. Lainson JS. *The Leishmaniases in Biology and Medicine*. London: Academic Press Inc; 1987.
 131. Andrade MS. *Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar na Zona da Mata Pernambuco, Brasil*. Recife: FIOCRUZ; 2004.

132. Jones TC, Johnson WD, Jr., Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis*. 1987;156:73-83.
133. Grimaldi G, Jr., Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg*. 1989;41:687-725.
134. Romero GA, Ishikawa E, Cupolillo E, Toaldo CB, Guerra MV, Paes MG, et al. The rarity of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* among patients from the Manaus region of Amazonas state, Brazil, who have cutaneous leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002;96:131-6.
135. Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65:456-65.
136. Azevedo AC, Costa SM, Pinto MC, Souza JL, Cruz HC, Vidal J, et al. Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103:760-7.
137. Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil. VI. Observations on the seasonal variations of *Lutzomyia flaviscutellata* in different types of forest and its relationship to enzootic rodent leishmaniasis (*Leishmania mexicana amazonensis*). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1972;66:709-17.
138. Ward RD, Lainson R, Shaw JJ. Some methods for membrane feeding of laboratory reared, neotropical sandflies (Diptera: Psychodidae). *Ann Trop Med Parasitol*. 1978;72:269-76.
139. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:581-96.
140. Passos VM, Fernandes O, Lacerda PA, Volpini AC, Gontijo CM, Degraive W, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the

- State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Trop.* 1999; 30;72(3):251-8.
141. Dorval ME, Oshiro ET, Cupollilo E, Castro AC, Alves TP. Occurrence of American tegumentary leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39:43-6.
 142. Costa JML. Estudo da leishmaniose cutânea difusa no Estado do Maranhão, Brasil: avaliação terapêutica e correlação do perfil imunológico entre pacientes e seus familiares. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998;31:401-3.
 143. Martins LM, Rebelo JM, dos Santos MC, Costa JM, da Silva AR, Ferreira LA. Eco-epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Buriticupu, Amazon region of Maranhao State, Brazil, 1996-1998. *Cad Saude Publica.* 2004;20:735-43.
 144. Travi BL, Osorio Y, Melby PC, Chandrasekar B, Arteaga L, Saravia NG. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infect Immun.* 2002;70:2288-96.
 145. Castellucci L, Cheng LH, Araujo C, Guimaraes LH, Lessa H, Machado P, et al. Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73:69-73.
 146. Alcais A, Abel L, David C, Torrez ME, Flandre P, Dedet JP. Evidence for a major gene controlling susceptibility to tegumentary leishmaniasis in a recently exposed Bolivian population. *Am J Hum Genet.* 1997;6:968-79.
 147. Deps PD, Viana MC, Falqueto A, Dietze R. [Comparative assessment of the efficacy and toxicity of N-methyl-glucamine and BP88 sodium stibogluconate in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000;33:535-43.

148. Saldanha AC, Romero GA, Merchan-Hamann E, Magalhaes AV, Macedo Vde O. A comparative study between sodium stibogluconate BP 88R and meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis. I. The efficacy and safety. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999 Jul-Aug;32(4):383-7.
149. Laguna-Torres VA, Silva CA, Correia D, Carvalho EM, Magalhaes AV, Macedo Vde O. Mefloquine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32:529-32.
150. Marsden PD, Tada MS, Barreto AC, Cuba CC. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis braziliensis* skin ulcers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1984;78:561-2.
151. Davies CR, Llanos-Cuentas EA, Sharp SJ, Canales J, Leon E, Alvarez E, et al. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: factors associated with variability in clinical symptoms, response to treatment, and parasite isolation rate. *Clin Infect Dis*. 1997;25:302-10.
152. Drugs for Neglected Diseases initiative. *Doenças negligenciadas, Leishmaniose*. www.dndi.org.br/Portugues/leishmaniose.aspx . Acessado em 30/05/2009.
153. Oliveira-Neto MP, Mattos M, Pirmez C, Fernandes O, Goncalves-Costa SC, Souza CF, et al. Mucosal leishmaniasis ("espundia") responsive to low dose of N-methyl glucamine (Glucantime) in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000;42:321-5.
154. Llanos Cuentas EA, Cuba CC, Barreto AC, Marsden PD. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1984;78:845-6.
155. Llanos-Cuentas EA, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC, Campos M. Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. *Lancet*. 1984;2:295.

156. Fourcade S, Huber FI, Blanchet D, Aznar C, Clyti E, Simon S, et al. Mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: a case report in an HIV-infected patient. *Med Trop (Mars)*. 2008;68:533-6.
157. Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Doncker SD, Ramirez L, et al. American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility. *J Infect Dis*. 2006;194:1168-75.
158. Marsden PD. Personal experience with diagnostic and therapeutic aspects of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Tres Bracos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994;89:485-7.
159. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Tres Bracos, Bahia-Brazil. *Rev Soc Bras Med Tropical*. 1994;27:93-101.
160. Franke ED, Wignall FS, Cruz ME, Rosales E, Tovar AA, Lucas CM, et al. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Ann Intern Med*. 1990;113:934-40.
161. Amato VS, Tuon FF, Campos A, Bacha HA, Nicodemo AC, Amato Neto V, et al. Treatment of mucosal leishmaniasis with a lipid formulation of amphotericin B. *Clin Infect Dis*. 2007;44:311-2.
162. Peters W, Evans DA, Lanham SM. Importance of parasite identification in cases of leishmaniasis. *J R Soc Med*. 1983;76:540-2.

10 ANEXO

Tabela dos pacientes selecionados com local de contaminação, idade, sexo, lesões e resultados de PCRs

Nº	Nome	Idade	Sexo	Lesões	Local Contaminação	Município	Nº Lesão	T Evolução	espécie
03/001	ASF	66	M	II a		Altamira	1	730	<i>L. (V.) braziliensis</i>
03/002	DSC	14	M	II a	Curua uma	SANTARÉM	1	28	<i>L. (V.) braziliensis</i>
03/003	DCNJ	33	M	V b	Forlandia	Aveiro	2	90	<i>L. (V.) braziliensis</i>
03/004	ARC	45	M	V c	Igarapá do anta	SANTARÉM	12	120	<i>L. (V.)</i> outras espécies
03/005	FIS	26	M	II a	Tabocal	SANTARÉM	1	120	<i>L. (V.)</i> outras espécies
03/006	RNE	43	M	IV c	Portão	Belterra	3	150	<i>L. (L.) amazonensis</i>
03/007	LSA	16	M	III b	Curuatinga	SANTARÉM	2	60	<i>L. (L.) amazonensis</i>
03/008	ECP	13	M	II b	Itaituba	Itaituba	2	60	<i>L. (V.)</i> outras espécies
03/009	FORC	31	M	III a	Santarém- Cuiabá km 101	Belterra	1	60	<i>L. (V.)</i> outras espécies
03/010	EA	42	M	II a	Garimpo Suriname	Guiana Francesa	1	34	<i>L. (V.)</i> outras espécies
03/011	HAR	26	M	III a		Monte Alegre	1	60	<i>L. (V.) braziliensis</i>
03/012	FAN	77	M	III a	Col do Moju	SANTARÉM	1	90	<i>L. (V.)</i> outras espécies
03/013	JCRS	27	M	III a	Curua uma	SANTARÉM	1	45	<i>L. (L.) amazonensis</i>
03/014	DND	20	M	II b	Vila Goreti R /Arapuins	SANTARÉM	2	30	<i>L. (V.)</i> outras espécies
03/015	RAL	39	F	III b	Garimpo Cripurizão	Itaituba	2	60	<i>L. (V.)</i> outras espécies
03/016	TLC	39	M	III a	Com Paraquer	SANTARÉM	1	15	<i>L. (V.)</i> outras espécies
03/017	FFPF	50	M	III a	Curua uma	SANTARÉM	1	60	<i>L. (V.)</i> outras espécies
03/018	RBS	25	M	III a	Deus Proverá	Uruará	1	90	<i>L. (V.) braziliensis</i>
03/019	GFO	20	M	III a	Com Pedra Branca	SANTARÉM	1	30	<i>L. (V.) braziliensis</i>
03/020	MAMC	26	M	III a		Novo progresso	1	30	<i>L. (V.) braziliensis</i>
03/021	JBM	22	M	III c		Oriximiná	3	60	<i>L. (V.) braziliensis</i>
03/022	JSM	21	M	III b	Placas	Placas	2	30	<i>L. (V.) braziliensis</i>
03/023	ECL	24	M	III b		Rurópolis	2	30	<i>L. (V.) braziliensis</i>
03/024	JSS	25	M	I a	Com Rio Claro	SANTARÉM	1	90	<i>L. (V.)</i> outras espécies
03/025	ESP	36	F	V b	Porção do Palhauzinho	SANTARÉM	2	60	<i>L. (V.) nao braziliensis</i>
03/026	WSF	22	M	III a	Santana do Ituqui	SANTARÉM	1	30	<i>L. (V.) braziliensis</i>
03/027	RARS	27	M	V b	SANTARÉM Cuiaba km 72	SANTARÉM	2	120	<i>L. (V.) braziliensis</i>
03/028	RSS	33	M	III a	Com Moreia	SANTARÉM	1	60	<i>L. (V.) braziliensis</i>
03/029	JPO	22	M	III a	Rio Aruanã	SANTARÉM	1	35	<i>L. (V.) braziliensis</i>
03/030	DSA	32	M	III a	São Jorge	Guiana Francesa	1	20	<i>L. (V.) braziliensis</i>
03/031	VNS	25	M	III a	Agua Azul	Rurópolis	1	120	<i>L. (V.)</i> outras espécies

03/033	MSS	17	M	II a	Iguarapá Pedra	SANTARÉM	1	60	L. (V.) não braziliensis
N°	Nome	Idade	Sexo	Lesões	Local Contaminação	Município	N° Lesão	T Evolução	
03/034	ESN	22	M	II a	Com Camburão	Alenquer	1	90	L. (V.) braziliensis
03/035	AHZF	18	M	V c	Travessão Cachoeira	Rurópolis	3	90	L. (V.) braziliensis
03/036	RCA	31	M	II a	Com Piquiatubá	SANTARÉM	1	30	L. (V.) outras espécies
03/037	VAB	30	M	III a	Garimpo Curinga	Novo progresso	1	90	L. (V.) outras espécies
03/038	ABP	17	M	IV b	SANTARÉM Cuiabá	SANTARÉM	2	210	L. (V.) outras espécies
03/040	JDP	36	M	II a	Porto Trombetas	Oriximiná	1	45	L. (V.) braziliensis
03/041	APS	26	M	V c	Rio Mana	Guiana Francesa	3	120	L. (V.) braziliensis
03/042	JCO	29	M	II b	Boa Esperança	SANTARÉM	2	15	L. (V.) outras espécies
03/043	MFS	24	M	III a	Curuatinga	SANTARÉM	1	120	L. (V.) braziliensis
03/044	IVM	42	M	III a	Com São Pedro	SANTARÉM	1	30	L. (L.) amazonensis
03/045	PRA	42	M	III a	Porto Trombetas	Oriximiná	1	30	L. (V.) braziliensis
03/046	MML	22	M	II a	SANTARÉM Cuiabá km88	Belterra	1	45	L. (V.) outras espécies
03/047	OCA	29	M	III a	Novo progresso	Novo progresso	1	60	L. (V.) braziliensis
03/048	IFP	37	M	III a	São Jose do Itaquí	SANTARÉM	1	90	L. (V.) braziliensis
03/049	JFS	30	M	III a	SANTARÉM Cuiabá km 160	Placas	1	60	L. (V.) braziliensis
03/050	VSS	47	M	III a	Iguarapá Anta	SANTARÉM	1	21	L. (V.) braziliensis
03/051	WAR	20	M	III a	Curua uma	SANTARÉM	1	90	L. (V.) braziliensis
03/052	IRF	24	M	III a	Novo progresso	Novo progresso	1	60	L. (V.) braziliensis
03/053	JRRR	23	M	III b	Curua uma	SANTARÉM	2	30	L. (V.) braziliensis
03/054	EVS	18	M	IV a	SANTARÉM Cuiabá km 124	Belterra	1	60	L. (V.) braziliensis
03/055	JCS	20	M	III a	Com Mentai R Arapuins	SANTARÉM	1	45	L. (V.) braziliensis
03/056	JFS	22	M	II b	Com Canaã	SANTARÉM	2	150	L. (V.) braziliensis
03/057	LPV	20	M	III a	R Arapuins	SANTARÉM	1	90	L. (V.) braziliensis
03/058	JCC	25	M	I a	Curua uma	SANTARÉM	1	30	L. (V.) braziliensis
03/059	DAS	42	M	III a	Com S. Luis Tapajós	Itaituba	1	30	L. (V.) outras espécies
03/062	JPS	24	M	III c	Com Aminã R Arapuins	SANTARÉM	3	30	L. (L.) amazonensis
03/063	JAB	20	M	IV a	SANTARÉM Cuiabá km 10 BR163	SANTARÉM	1	60	L. (V.(braziliensis))
03/064	APS	28	M	III c	Mojú dos Campos	SANTARÉM	5	30	L. (V.) braziliensis
03/065	COC	24	M	II c	Com Guaraná	SANTARÉM	3	30	L. (V.) outras espécies
03/066	NMCC	22	M	III a	Rio Arapuins	SANTARÉM	1	90	L. (V.) outras espécies
03/067	CAS	22	M	II a	Acaratinga	SANTARÉM	1	60	L. (V.) outras espécies
03/070	JLOF	28	M	III b	SANTARÉM Cuiabá Col Farras	SANTARÉM	2	20	L. (V.) outras espécies
03/071	MRB	22	M	III a	SANTARÉM Cuiabá Col. P. Gde.	SANTARÉM	1	45	L. (V.) braziliensis

03/072	RMA	15	M	III a	SANTARÉM Cuiabá km 97	Belterra	1	45	L. (V.) outras espécies
03/073	PFB	46	M	II a	Planalto Verde	SANTARÉM	1	30	L. (V.) <i>braziliensis</i>
03/074	RPM	23	M	II a	Jauruçu	Altamira	1	90	L. (V.) outras espécies
N°	Nome	Idade	Sexo	Lesões	Local Contaminação	Município	N° Lesão	T Evolução	
03/075	EPM	20	M	IV a	Curuá uma	SANTARÉM	1	60	L. (V.) <i>braziliensis</i>
03/076	RJPC	39	M	III a	Rio Mujú	SANTARÉM	1	30	L. (V.) <i>braziliensis</i>
03/077	FAM	28	M	V b	Mojuí dos Campos	SANTARÉM	2	15	L. (V.) <i>braziliensis</i>
03/079	MMC	19	M	V b	Corta corda Curua uma	SANTARÉM	2	90	L. (V.) <i>braziliensis</i>
03/080	NUS	20	M	II a	São Pedro	SANTARÉM	1	90	L. (V.) outras espécies
03/081	GAS	21	M	V c	Iguarapé da Pedra	SANTARÉM	4	60	L. (V.) <i>braziliensis</i>
03/082	FFS	46	M	II c	SANTARÉM Cuiabá km 101	Belterra	3	30	L. (V.) outras espécies
03/083	MPS	29	M	II a	Curuatinga	SANTARÉM	1	60	L. (L.) <i>amazonensis</i>
03/084	NSG	38	M	III c	Cipoal	SANTARÉM	3	30	L. (V.) <i>braziliensis</i>
03/085	ASV	24	M	III a	Curuatinga	SANTARÉM	1	60	L. (V.) <i>braziliensis</i>
03/086	RACS	27	M	II a	Com Jauruçu	Porto de Moz	1	60	L. (V.) outras espécies
03/087	RSS	31	F	III b	SANTARÉM Cuiabá km 135	Belterra	2	60	L. (V.) outras espécies
03/088	RSS	32	F	V b	Sítio São Francisaco	Manaus	2	60	L. (V.) <i>braziliensis</i>
03/090	JLS	28	M	III a	Com Juquí	Monte Alegre	1	30	L. (V.) outras espécies
03/091	SJM	35	M	II a	Juruti	Juruti	1	120	L. (V.) <i>braziliensis</i>
03/092	TWC	23	M	III c	SANTARÉM Cuiabá km 101	Belterra	3	30	L. (V.) não <i>braziliensis</i>
03/093	IFM	22	M	III a	Garimpo Sta Isabel	Itaituba	1	60	L. (V.) outras espécies
03/094	RJC	19	M	III a	Com Cametá	Aveiro	1	60	L. (V.) <i>braziliensis</i>
03/095	LCA	17	F	III b	Assentamento Prainha	SANTARÉM	2	60	L. (V.) <i>braziliensis</i>
03/096	ARP	20	M	III b	Vila Boa Esperança	SANTARÉM	2	60	L. (V.) <i>braziliensis</i>
03/097	DRG	?	M	II a	Lago Grande	SANTARÉM	1	30	L. (V.) <i>braziliensis</i>
03/098	JRAS	23	M	III b	SANTARÉM Cuiabá km 124	Belterra	2	60	L. (V.) <i>braziliensis</i>
04/099	LRDG	39	M	III a	Coatá	Guiana Francesa	1	20	L. (V.) <i>braziliensis</i>
04/100	JLGS	33	M	III a	Com S. Fco. R Arapuins	SANTARÉM	1	90	L. (V.) <i>braziliensis</i>
04/101	CHPS						1		L. (V.) outras espécies