

**CLÁUDIA ÁLVARES CALVO ALESSI**

**Leishmaniose cutânea americana no Pontal do  
Paranapanema - SP: avaliação clínica, histopatológica e  
uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) para  
identificação e caracterização das espécies de  
*Leishmania***

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

Área de Concentração: Patologia  
Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo  
Pereira Corbett

São Paulo

**2007**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

A Deus, que permite tão grandes  
coisas em minha vida!

“Ando devagar porque já tive pressa  
e levo esse sorriso, porque já chorei demais.  
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe  
eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei  
Conhecer as manhãs e as manhãs,  
o sabor das massas e das maçãs,  
é preciso amor pra poder pulsar,  
é preciso paz pra poder sorrir,  
é preciso a chuva para florir...  
...Penso que cumprir a vida seja simplesmente  
compreender a marcha, e ir tocando em frente...  
Um dia a gente chega, no outro vai embora  
Cada um de nós compõe a sua história,  
e cada ser em si, carrega o dom de ser capaz,  
e ser feliz.”  
(Almir Sater)

Aos meus pais, Cândia e Irineu Calvo,  
cujo amor, estímulo e valores sempre me guiarão.

Obrigada pelo apoio incondicional.

Ao meu marido, Haroldo César, e aos meus filhos,

Angélica e Henrique César, que aceitaram

pacientemente

a inconveniência e a separação associada à minha

preocupação com este trabalho.

Obrigada pela compreensão aos vários momentos não compartilhados.

## AGRADECIMENTOS

Ao iniciar os agradecimentos, lembrei de um pensamento de Platão, que diz: “Grandes Caminhadas começam com a decisão do primeiro passo”. Esta pequena frase reflete o momento que estou vivendo atualmente. Foram tantas idas e vindas; de carro, convencional, leito, avião... foram tantos erros, acertos, noites mal dormidas, tentativas, alegrias...lágrimas... tudo isso me levou a conhecer mundos e pessoas, que jamais teria conhecido se não tivesse tido a coragem de dar o primeiro passo. Portanto, gostaria de agradecer ao Professor Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett pela orientação, apoio constante e compreensão silenciosa dos momentos difíceis pelos quais passei. A sua disponibilidade irrestrita, sua forma exigente, crítica e criativa de argüir as idéias apresentadas, muito contribuíram para nortear este trabalho.

À professora Dra. Lucile Maria Floeter-Winter que me acolheu em seu laboratório, dando-me tranquilidade e credibilidade no desenvolvimento desta tese.

À Unoeste (Universidade do Oeste Paulista), em especial ao Prof. Jerson Belaz e à Profa. Ana Maia de Oliveira Lima, pela oportunidade e apoio recebido.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de aprendizagem e crescimento científico.

Ao colega Dr. Tiago Moreno Castilho, pela compreensão, supervisão e auxílio na execução das técnicas moleculares, sempre esclarecendo minhas dúvidas.

Ao Dr. Antônio Plácido Pereira, um grande e experiente patologista da região, que colocou seu laboratório à disposição para a execução de técnicas de imunohistoquímica e HE, além de ceder as biópsias para a realização da PCR. Meu muito obrigada.

À Dra. Sandra Maria Mortari Lotfi, do Centro de Vigilância Epidemiológica de Presidente Prudente, que pacientemente forneceu os casos notificados no Pontal do Paranapanema.

À Dra. Elisa San Martin Mouriz Savani pela troca de idéias e colaboração neste trabalho. Obrigada por sempre ter uma palavra amiga de incentivo e apoio.

À Dalila Certo, pela correção e formatação desta tese. Obrigada pela paciência.

À Lia Negrão e Zenaide Forçan, sempre prestativas, “atentas” a tudo que dizia respeito ao trabalho e principalmente, sempre bem humoradas, aliviando assim, a saudades que sentia dos filhos. Foram poucos, mas inesquecíveis nossos ‘passeios’ de família.

Ao Luiz Felipe Domingues Passero, pela simpatia e pela colaboração nas fotos.

A minha querida irmã, Luciana Calvo Penha, que tem sido ao longo de todos esses anos, minha maior amiga. Sua presença singela, nobreza de alma e generosidade incomparável, faz o dia melhorar cada vez que nos encontramos.

Ao meu irmão, Emanuel Alvares Calvo, pelo apoio e incentivo nessa caminhada.

A Flávia Noris Chagas Leli, Selma Zambeli de Freitas e Nádia de Araújo Miguel, que sem nunca questionarem, sempre facilitaram minhas idas à São Paulo.

A profa. Coordenadora Maria Inês dos Santos Balarim e sua equipe - Péricles Zevizier Nunes e Andréa Aparecida T. Tavares Martinez, pelas várias mudanças nos horários das minhas aulas, em função das viagens. Obrigada pela compreensão.

Ao prof. Emerson Wruck, que sempre se fez compreender, mesmo estando tão distante fisicamente. Obrigada pela análise estatística.

Ao Ediléu H. Cardoso Júnior, pela amizade que surgiu no mestrado e ainda permanece. Obrigada por sempre me atender prontamente, embora cheio de compromissos com a Faculdade de São Carlos.

A Dra. Maria Aparecida da Silva e Dra.Nair Toshiko Tashima por terem sentido todas as dificuldades de se fazer pós-graduação em outra cidade, e por isso, sempre me apoiarem. Obrigada.

A querida Carla Fitipaldi Philadelphi Jatene, que sempre levou e buscou meus filhos nas escolas nos dias que estava ausente. Obrigada por ter me ajudado por tanto tempo.

Aos meus sogros Haroldo Angelo Alessi e Maria Darcy Krasuscki Alessi, que souberam ser pacientes e carinhosos com meus filhos. Obrigada pelos momentos agradáveis em família.

Aos meus acadêmicos da Unoeste, em especial a Natieli do Nascimento, Elyanne Gomes, José Hercules Dantas Ribeiro e Ricardo da Silva, que de várias maneiras estimularam a realização desta pesquisa.

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. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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



## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo.

Summary

1. INTRODUÇÃO .....	2
1.1 Aspectos gerais .....	2
1.2 Distribuição Geográfica e Antecedentes Históricos da Leishmaniose Tegumentar Americana .....	5
1.3 Aspectos Clínicos e Histopatológicos da LCA .....	8
1.4 Diagnóstico das Leishmanioses .....	11
1.4.1 Pesquisa direta .....	12
1.4.2 Cultivo “in vitro” .....	13
1.4.3 Inoculação em “hamster” .....	13
1.4.4 Sorologia por imunofluorescência, Elisa ou aglutinação direta .....	14
1.4.5 Intradermorreação de Montenegro (IDRM) .....	15
1.4.6 Biópsia: histopatologia e imunohistoquímica .....	16
1.4.7 PCR .....	18
2. AS LEISHMANIOSES NO ESTADO DE SÃO PAULO COM ÊNFASE NO PONTAL DO PARANAPANEMA E O MST .....	22
3. OBJETIVOS .....	31
3.1 Geral .....	31

3.2	Específico .....	31
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	33
4.1	Descrição da Área de Estudo .....	33
4.1.1	Aspectos Gerais .....	33
4.1.1.1	Geomorfologia .....	33
4.1.1.2	Economia .....	35
4.1.1.3	Movimentos Sociais no Pontal do Paranapanema .....	35
4.1.2	Características Locais .....	37
4.2	Inquérito Humano .....	39
4.2.1	População Estudada .....	39
4.3	Metodologia dos Exames de Laboratório .....	40
4.3.1	Identificação do Parasita nas Lâminas coradas pela HE .....	40
4.3.2	Identificação do Parasita pela Imunohistoquímica .....	41
4.3.3	Controles .....	43
4.3.4	Identificação do Parasita através da reação em cadeia da polimerase .....	43
4.3.4.1	Extração de DNA em blocos de parafina .....	43
4.3.4.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	45
	A. Sequência alvo DNA ribossômico (rDNA) .....	45
	B. Sequência alvo: gene G6PD .....	47
4.3.4.3	Eletroforese em gel de agarose .....	48
4.3.4.4	Purificação de produtos da PCR .....	49
4.3.4.5	Seqüenciamento de DNA .....	50
4.3.4.6	Análise dos resultados .....	52

5. RESULTADOS .....	54
5.1 Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose cutânea no Pontal do Paranapanema .....	54
5.2 Aspectos clínicos e histopatológicos dos casos de Leishmaniose Cutânea Americana no Pontal do Paranapanema .....	57
5.3 Diagnóstico parasitológico da Leishmaniose Cutânea no Pontal do Paranapanema .....	65
5.3.1 Exames parasitológicos: parasitas nas lesões pela histopatologi. HE .....	65
5.3.1.1 Identificação do Parasita pela histotopatologia, HE .....	66
5.3.1.2 Identificação do Parasita através da reação de Imunohistoquímica (IH) .....	69
5.3.1.3 Identificação e classificação dos parasitas por métodos moleculares, PCR .....	74
5.3.1.4 Avaliação da taxa de concordância entre HE e PCR..	80
5.3.1.5 Avaliação da taxa entre IH e PCR .....	82
6. DISCUSSÃO .....	87
7. CONCLUSÕES .....	99
8. ANEXOS .....	101
9. REFERÊNCIAS .....	112

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Vista Parcial do Parque Estadual Morro do Diabo.	26
<b>Figura 2</b>	Distritos do Pontal do Paranapanema, São Paulo, Brasil.	34
<b>Figura 3</b>	Visão geral da vegetação do Morro do Diabo.	37
<b>Figura 4</b>	Variação de incidência dos casos de LCA ocorridos no Pontal do Paranapanema entre março de 1995 e dezembro de 2004.	54
<b>Figura 5</b>	Distribuição dos casos de LCA segundo a faixa etária. Pontal do Paranapanema – SP.	56
<b>Figura 6</b>	Formas clínicas dos casos notificados no Pontal do Paranapanema.	58
<b>Figura 7</b>	Associação entre número de lesões e sexo dos indivíduos, notificados no Pontal do Paranapanema, SP.	60
<b>Figura 8</b>	Infiltrado inflamatório mononuclear na pele rico em plasmócitos. HE. AO: x400.	62
<b>Figura 9</b>	Reação granulomatosa na pele. HE. AO: x 400.	62
<b>Figura 10</b>	Reação granulomatosa na pele com células gigantes. HE. AO: x400.	63
<b>Figura 11</b>	Reação granulomatosa na pele com necrose. HE. AO: x400.	63
<b>Figura 12</b>	Reação granulomatosa com necrose e células gigantes. HE. AO: x 400.	64
<b>Figura 13</b>	Porcentagem de Casos por Padrão Histopatológico Granulomatoso.	65
<b>Figura 14</b>	Pesquisa do parasita segundo o sexo. Técnica HE.	67
<b>Figura 15</b>	Pesquisa do parasita na pele em bópsias, HE. Pontal do Paranapanema, São Paulo.	68
<b>Figura 16</b>	Análise do padrão histopatológico com relação ao índice de parasitismo em biópsias. Pontal do Paranapanema, SP.	69

<b>Figura 17</b>	Reação de imunohistoquímica. Anticorpo policlonal. Baixo parasitismo. AO: x400.	70
<b>Figura 18</b>	Reação de imunohistoquímica. Anticorpo policlonal. Alto parasitismo. AO: x400.	71
<b>Figura 19</b>	Associação entre imunohistoquímica e sexo dos pacientes.	72
<b>Figura 20</b>	Análise comparativa dos resultados positivos obtidos por IH e HE.	74
<b>Figura 21</b>	Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da PCR obtido com os oligonucleotídeos S4 e S12. M = marcador molecular lambda/ <i>Hind</i> III; canaletas de 1 a 21 = DNA de amostras de biópsias; 22 = controle negativo sem DNA; 23 = controle positivo DNA de L.	75
<b>Figura 22</b>	Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da PCR obtido com os oligonucleotídeos S17 e S18.	75
<b>Figura 23</b>	Seqüências de nucleotídeos determinadas para o produto da “nested” – PCR de DNA das amostras alinhadas com as seqüências de cepas de referência do SSU rDNA, conforme descrito por ULIANA et al. (1994), permitindo a identificação da espécie de <i>Leishmania</i> .	76
<b>Figura 24</b>	Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da PCR obtido com os oligonucleotídeos ISVC ISVB.	76
<b>Figura 25</b>	Resultados gerais da PCR.	77
<b>Figura 26</b>	Associação entre sexo do indivíduo e a técnica da PCR.	78
<b>Figura 27</b>	Níveis de caracterização utilizando PCR e seqüenciamento.	79
<b>Figura 28</b>	Avaliação do nível de concordância entre HE e PCR.	81
<b>Figura 29</b>	Avaliação do nível de concordância entre HE e PCR.	82
<b>Figura 30</b>	Avaliação do nível de concordância entre IH e PCR. .	83
<b>Figura 31</b>	Comparação dos resultados pela PCR e IH.	84
<b>Figura 32</b>	Comparativo acumulado entre HE, IH e PCR. .	85

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	São Paulo - municípios com maior número de ocupações 1990 – 2004.	36
<b>Tabela 2</b>	Ciclos térmicos da PCR.	46
<b>Tabela 3</b>	Ciclos térmicos da PCR.	47
<b>Tabela 4</b>	Ciclos térmicos da PCR.	48
<b>Tabela 5</b>	Reação de seqüência.	51
<b>Tabela 6</b>	Reação de seqüenciamento.	51
<b>Tabela 7</b>	Distribuição dos casos de LCA segundo sexo. Pontal do Paranapanema - SP.	55
<b>Tabela 8</b>	Distribuição da LCA segundo a faixa etária. Pontal do Paranapanema – SP.	55
<b>Tabela 9</b>	Medidas descritivas básicas da variável idade nas notificações de LCA no Pontal do Paranapanema – SP.	57
<b>Tabela 10</b>	Formas clínicas dos casos notificados no Pontal do Paranapanema – SP.	57
<b>Tabela 11</b>	Associação entre formas clínicas e sexo dos indivíduos do Pontal do Paranapanema – SP.	59
<b>Tabela 12</b>	Associação entre número de lesão e sexo dos indivíduos do Pontal do Paranapanema – SP.	59
<b>Tabela 13</b>	Associação entre sexo e o número de lesões.	60
<b>Tabela 14</b>	Porcentagem de Casos por Padrão Histopatológico Granulomatoso.	65
<b>Tabela 15</b>	Coloração pela HE.	66
<b>Tabela 16</b>	Pesquisa do parasita segundo o sexo. Técnica HE.	67
<b>Tabela 17</b>	Análise do padrão histopatológico com relação ao índice de parasitismo em biópsias. Pontal do Paranapanema, SP.	68

<b>Tabela 18</b>	Resultados da reação de imunohistoquímica.	71
<b>Tabela 19</b>	Associação entre Imunohistoquímica e sexo dos pacientes.	72
<b>Tabela 20</b>	Índice de concordância entre HE e IH.	73
<b>Tabela 21</b>	Resultados gerais da PCR.	77
<b>Tabela 22</b>	Associação entre sexo do indivíduo e a técnica da PCR.	78
<b>Tabela 23</b>	Avaliação do nível de concordância entre HE e PCR.	80
<b>Tabela 24</b>	Avaliação do nível de concordância entre IH e PCR.	83
<b>Tabela 25</b>	Taxas de concordância entre HE, IH e PCR.	84
<b>Tabela 26</b>	Comparativo entre HE, IH e PCR.	85

## ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>µl</b>	microlitro
<b>µM</b>	microMol
<b>CAPPesq</b>	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
<b>CVE</b>	Centro de Vigilância epidemiológica
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxinucleotídeo trifosfato
<b>G6PD</b>	Glicose 6 fosfato desidrogenase
<b>GC</b>	Guanina citosina
<b>HE</b>	Hematoxilina eosina
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IH</b>	Imunohistoquímica
<b>IPE</b>	Instituto de Pesquisas Ecológicas
<b>ITESP</b>	Instituto de Terras de São Paulo
<b>LCDA</b>	Leishmaniose cutânea difusa anérgica
<b>LCDB</b>	Leishmaniose cutânea disseminada Bordeline
<b>LCL</b>	Leishmaniose cutânea localizada
<b>LCM</b>	Leishmaniose cutânea-mucosa
<b>mM –</b>	miliMol
<b>MST</b>	Movimento dos trabalhadores rurais sem terra
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampão fofato
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PEMD</b>	Parque Estadual Morro do Diabo
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>PSF</b>	Programa de Saúde da Família
<b>Q1</b>	Primeiro quartil
<b>Q3</b>	Terceiro quartil
<b>Qsp</b>	Quantidade suficiente para
<b>rDNA</b>	DNA ribossômico
<b>RG</b>	Reação granulomatosa



<b>RGCG</b>	Reação granulomatosa com células gigantes
<b>RGN</b>	Reação granulomatosa com necrose
<b>RGNCG</b>	Reação granulomatosa com necrose e células gigantes
<b>SINAN</b>	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
<b>SSU</b>	Subunidade menor do ribossomo

## RESUMO

Allessi CAC. Leishmaniose cutânea americana no Pontal do Paranapanema - SP: avaliação clínica, histopatológica e uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação e caracterização das espécies de *Leishmania* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 132 p.

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e são importante problema de saúde pública. A leishmaniose cutânea americana é considerada doença autóctone do continente americano e se apresenta com diversas formas clínicas, que dependem da espécie que causa a infecção e de outros fatores como virulência e capacidade de evasão do sistema immune. São reconhecidas seis espécies de *Leishmania* que causam casos humanos de LCA no Brasil, destas, cinco pertencem ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania*. Elas são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) naiffi* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A transmissão da leishmaniose cutânea se mantém na região do Pontal da Paranapanema, com 20 casos notificados em 2006. A *Leishmania (V.) braziliensis* é a única espécie considerada como agente da doença na região, com identificação dos vetores envolvidos e de possíveis reservatórios silvestres. O objetivo do trabalho é o estudo dos aspectos epidemiológicos, clínicos e histopatológicos da leishmaniose cutânea no

Pontal do Paranapanema e a identificação, por métodos moleculares, PCR, do agente etiológico e a caracterização do gênero, subgênero e a espécie de *Leishmania* presentes na região. A doença foi encontrada em ambos os sexos, predominando no sexo masculino (67,9%), em todas as faixas etárias, mas 70,5% estavam na faixa de 20 a 49 anos de idade. A forma clínica mais encontrada foi a cutânea, com 92,3% dos casos. A pesquisa de parasita na lesão em 78 pacientes que realizaram biópsias foi positiva em 40 amostras (51.3%), em lâminas coradas pela HE; quando se utilizou a IH foi 66,7%. O índice de concordância entre as técnicas da HE e IH foi de 58,97%. Entretanto, 10 casos negativos na IH foram positivos na HE, e de 38 casos negativos na HE, 22 foram positivos na IH. Isto mostra que há necessidade de associação dos dois métodos. A positividade na PCR foi de 53,8%. Avaliando-se os resultados obtidos nesse estudo, podemos verificar que dos 40 casos positivos pela HE, 24 também foram positivos pela PCR; porém, 16 destes, foram negativos pela PCR. Em contrapartida, das 38 amostras negativas na HE, 18 delas foram positivas pela PCR. Pela imunohistoquímica, do total de 26 amostras negativas, apenas 12 permaneceram negativas e 14 foram positivas na PCR; enquanto que, das 52 amostras positivas pela IH, 28 foram positivas e 24 negativas pela PCR. Os níveis de concordância da PCR com HE foram de 56,41% e da PCR com IH de 51,28%. Esses resultados reforçam a idéia da necessidade de se associar os três métodos para o diagnóstico da LC. As características das lesões histopatológicas foram: reação granulomatosa (RG) encontradas em 71,85%, reação granulomatosa com células gigantes (RGCG) em 12,8%,

reação granulomatosa com necrose (RGN) em 10,3% e reação granulomatosa com necrose e células gigantes (RGNCG) em 5,1% dos casos. Utilizando-se os primers SSU rDNA S17/S18, foi possível caracterizar, através do seqüenciamento, 27 (34,6%) amostras como sendo do subgênero *Viannia* e 06 amostras como *L. (L.) amazonensis*. Este estudo identificou o primeiro caso de *L. (L.) amazonensis* na região.

Descritores: 1.Leishmaniose cutânea; 2.*Leishmania*; 3.*Leishmania braziliensis*; 4.Doenças parasitárias; 5.Reação em cadeia da polymerase.

## SUMMARY

Allessi CAC. American cutaneous leishmaniasis in the Pontal do Paranapanema – SP: clinical, histopathological evaluation and use of Polymerase Chain Reaction (PCR) for identification and characterization of the *Leishmania* species. [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2007. 132 p.

Leishmaniasis are parasitic diseases caused by protozoans of the *Leishmania* genus and are important public health problems. American cutaneous leishmaniasis (ACL) is considered an autochthonous disease of the American continent and presents several clinical forms which depend on the causative species of the infection and other factors such as virulence and ability to evade the immune system. Six *Leishmania* species are recognized to cause human ACL cases in Brazil of which five belong to the *Viannia* and one to the *Leishmania* subspecies. They are: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) naiffi* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Cutaneous leishmaniasis transmission is maintained in the Pontal do Paranapanema region, with 20 notified cases in 2006. *Leishmania (V.) braziliensis* is the only species considered to be the disease agent in the region with identification of the involved vectors and possible wild reservoirs. The aim of this research is the studies of the epidemiological, clinical and histopathological aspects of cutaneous leishmaniasis in the Pontal do Paranapanema and the identification by molecular methods, PCR, of the etiologic agent and characterization of the *Leishmania* genus, subgenus and species present in the region. The disease was found in both genders, with predominance of males (67.9%), in all age ranges, but 70.5% were in the range of 20 to 49 years. The cutaneous was the mostly found clinical form with 92.3% of the cases. Search for the parasite in the lesion of 78 patients who underwent biopsies was positive in

40 samples (51.5%), in HE stained slides; when IH was used, 66.7% were positive. Agreement index between the HE and IH techniques were 58.97%. However, 10 negative cases using IH were positive with HE, and of 38 HE negative cases 22 were positive using IH. This shows that association of the two methods is needed. Using PCR, there was a positivity of 53.8%. Evaluating the results obtained in this study, we may observe that of the 40 HE positive cases 24 were also positive on PCR; but 16 of these were PCR negative. Contrariwise, of the 38 HE negative samples 18 were positive PCR. Using immunohistochemistry, of the total of 38 HE negative samples, 18 were positive with PCR; while of the 52 IH positive samples, 28 were positive and 24 negative on PCR. Agreement levels of PCR with HE were 56.41%, and of PCR with IH 51.28%. These results reinforce the idea of the need for association of the three methods for CL diagnosis. Histopathological lesion characteristics were: granulomatous reaction (GR) found in 71.85%, granulomatous reaction with giant cells (GRGC) in 12.8%, granulomatous reaction with necrosis (GRN) in 10.3% and granuloma with necrosis and giant cells (GRNGC) in 5.1% of the cases. Using SSU rDNAS 17/S18 primers it was possible to characterize through sequencing 27 (34.6%) samples as being of the *Viannia* subgenus and 06 samples of the *L. (L.) amazonensis*. This study identified the first *L. (L.) amazonensis* case in the region.

Descriptors: 1.Cutaneous leishmaniasis; 2.*Leishmania*; 3.*Leishmania braziliensis*; 4.Parasite disease; 5.polymerase chain reaction.

# INTRODUÇÃO

---

## 1. Introdução

### 1.1 Aspectos Gerais

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários digenéticos, da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903).

Constituem um importante problema de saúde pública e incide de forma endêmica em 88 países.

A incidência global estimada é de 600.000 novos casos por ano. Entretanto, acredita-se que o número real esteja entre 1.5 e 2 milhões, sendo que existem aproximadamente 12 milhões de pessoas infectadas (ASHFORD et al., 1992; WHO, 2007).

Vários mamíferos silvestres e domésticos, como roedores, canídeos, endentados e marsupiais, são os hospedeiros vertebrados da *Leishmania*.

As leishmanioses são agrupadas em duas categorias clínicas: a leishmaniose visceral e a leishmaniose cutânea que se apresenta como Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose mucocutânea (LMC), Leishmaniose Cutânea Difusa Anérgica (LCDA), e Leishmaniose Cutânea Disseminada Bordeline (LCDB), forma intermediária entre a LCL e os pólos anérgicos e hiperérgicos, ou seja, a LCD e a LMC respectivamente. Estas formas dependem da espécie que causa a infecção entre outros



aspectos. Diferentes espécies apresentam diferentes fatores de virulência e mecanismo de evasão do sistema imune (SILVEIRA et al., 2004).

Nas Américas a doença dermatológica associada a este protozoário é, genericamente denominada Leishmaniose Cutânea Americana (LCA) (MARZOCHI, 1992). São reconhecidas seis espécies de *Leishmania* que atuam na etiologia de casos humanos de LCA no Brasil, destas, cinco pertencem ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania* (LAINSON e SHAW, 1987).

- *Leishmania (Viannia) braziliensis* VIANNA, 1911;
- *Leishmania (Viannia) guyanensis* FLOCH, 1954;
- *Leishmania (Viannia) lainsoni* SILVEIRA, SHAW, BRAGA e ISHIKAWA, 1987;
- *Leishmania (Viannia) shawi*, LAINSON, BRAGA, DE SOUZA, PÓVOA, ISHIKAWA e SILVEIRA, 1989;
- *Leishmania (Viannia) naiffi*, LAINSON e SHAW, 1989;
- *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, LAINSON e SHAW, 1972.

Os protozoários deste gênero apresentam em seu citoplasma, o cinetoplasto, que é uma mitocôndria que contém DNA composto de maxi e minicírculos (SIMPSON, 1987).

A *L. (V.) braziliensis* é o agente etiológico mais importante da LCA não apenas no Brasil, mas também em toda América Latina, sendo a primeira espécie de *Leishmania* descrita e incriminada como agente da LCA nas Américas (VIANNA, 1911).

A *Leishmania (V.) braziliensis* tem distribuição geográfica que inclui várias regiões da América do Sul e Central. No Brasil, as espécies do subgênero *Viannia* estão presentes nos seguintes Estados: Amazonas, Pará, Maranhão, Ceará, Pernambuco, Paraíba, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Amapá, Rondônia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás. Essa ampla distribuição implica em variações epidemiológicas e ecológicas que são peculiares em cada região (DEDET, 1993; NEVES, 2000).

A forma cutânea-mucosa é conhecida no Peru como espúndia. Ela aparece meses ou anos após a lesão cutânea primária, em geral com o comprometimento da nasofaringe.

A LCA se apresenta com diferentes padrões regionais, da Amazônia ao Sudeste do Brasil. Ela está associada prioritariamente à *Leishmania (V.) braziliensis*, apresenta diversos aspectos em relação aos vetores envolvidos, aos possíveis reservatórios silvestres, hospedeiros acidentais, padrão de transmissão e perfil ecoepidemiológico (SHAW e LAINSON, 1987).

A transmissão clássica da leishmaniose cutânea no Brasil, pela *L. (V.) braziliensis*, tem origem silvestre, o homem adquire a protozoose ao adentrar no foco natural onde coexistem reservatórios e vetores silvestres (DEDET, 1993).

Outra espécie de interesse médico é a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, que foi detectada na Bacia Amazônica, nos Estados do Amazonas e do Pará, que deu origem ao seu nome. O ciclo de transmissão é mantido preferencialmente à noite, e está associado a florestas úmidas, na

base das árvores. A infecção no homem ocorre também durante a noite, atingindo principalmente pescadores e caçadores, provocando lesões cutâneas localizadas, ricas em parasitas e é responsável, também, por casos de leishmaniose cutânea disseminada e anérgica difusa no Brasil.

Os vetores são dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Nas Américas, existem cerca de 470 espécies, das quais, aproximadamente, 60 estão envolvidas na transmissão das leishmanioses (GALATI et al., 2003).

Em São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Espírito Santo e Minas Gerais, os vetores mais comumente incriminados na transmissão da *Leishmania (V.) braziliensis* são *Nyssomyia intermedia* e *Nyssomyia whitmani*.

O vetor conhecido na transmissão da *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, é o flebotomíneo *Bichromomyia flaviscutellata* (MANGABEIRA, 1942), inseto com hábitos noturnos, atraído por roedores, particularmente pelo *Proechimys*.

## **1.2 Distribuição Geográfica e Antecedentes Históricos da Leishmaniose Tegumentar Americana**

No Velho Mundo, existem descrições sobre a ocorrência da leishmaniose cutânea no primeiro século d.C. na Ásia Central, onde a moléstia era conhecida como “úlceras de Balkh”, nome derivado da cidade de Balkh, no norte do Afeganistão. Outros nomes podem ser encontrados na

literatura médica antiga como, “úlceras de Bagdad”, “botão de Biskra”, “botão do Oriente”, etc. (LAINSON, 1997).

A leishmaniose cutânea americana é considerada doença autóctone do continente americano. Essa afirmação baseia-se no encontro arqueológico de cerâmicas do período Pré-Colombiano, chamados “Huacos”, que são representações de ídolos Incas, mostrando faces humanas com deformidades semelhantes às lesões causadas pela LCA (LAINSON, 1983).

A LCA distribui-se amplamente no continente americano, estendendo-se do sul dos Estados Unidos (Texas) ao norte da Argentina, na América do Sul apenas o Chile e Uruguai não apresentam registros dessa protozoose (LAINSON, 1983). No Brasil, a LCA tem sido confirmada em todos os estados brasileiros (LAINSON, 1997) e tem merecido atenção, não só pelo aumento das taxas de incidência associadas às altas taxas de morbidade e à capacidade destrutiva de mucosas e pele, mas também pela sua distribuição geográfica e expansão para novas áreas, principalmente, centros urbanos como Manaus, AM, e Belo Horizonte, MG (BRANDÃO-FILHO e SHAW, 1994).

Segundo a Revista Médica de São Paulo (1909), a primeira identificação do agente etiológico no Brasil foi feita por LINDENBERG, CARINI e PARANHOS que, independentemente, demonstraram formas amastigotas, que chamaram de “corpúsculos de Leishman-Donovan”, em lesões cutâneas de pacientes do Estado de São Paulo, semelhante ao parasita que causa o botão do Oriente (leishmaniose cutânea do Velho Mundo). Mas, foi MATTA, em 1916, que deu o nome ao parasita de *Leishmania braziliensis*.

Naquela época já se suspeitava do modo de transmissão da doença. A ocorrência das lesões, preferencialmente em partes descobertas do corpo e a acentuada variação sazonal da doença, indicavam que a transmissão era realizada por um vetor. BRUMPT e PEDROSO, já em 1913, relatavam as primeiras observações da doença, denominando-a leishmaniose americana das florestas, em alusão ao fato de que sua transmissão estava relacionada com o ambiente silvestre.

Em 1922, ARAGÃO realizou no Rio de Janeiro, pela primeira vez nas Américas, a transmissão experimental da doença por flebotomos através da inoculação no focinho de um cão, de macerado de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Nyssomyia intermedia*, infectadas após sugarem lesões cutâneas de pacientes.

PESSÔA e PESTANA (1940), examinando um grande número de flebotomos do Estado de São Paulo encontram infecções naturais de “leptomonas” (promastigotas) em *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia pessoai* e *Migonemyia migonei*.

No passado, a infecção humana estava relacionada com a entrada do homem em ambientes florestais, onde ocorre o ciclo silvestre do parasita, sendo que os indivíduos acometidos eram, basicamente, adultos do sexo masculino (GOMES et al., 1990; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994).

Atualmente, a LCA apresenta-se em fase de expansão geográfica. Nas últimas décadas tem sido detectada mudança no comportamento, coexistindo um duplo perfil epidemiológico; um expresso pela manutenção de casos oriundos dos focos antigos ou áreas próximas a eles, e outro pelo

aparecimento de surtos epidêmicos, associados a fatores decorrentes de processos migratórios de população, crescimento e urbanização desordenados em áreas rurais onde existem o ciclo zoonótico e mudanças ambientais produzidas pelo homem.

### **1.3 Aspectos Clínicos e Histopatológicos da LCA**

Vários autores têm discutido a histopatologia da LCA. LINDENBERG (1909), além de ter reconhecido o agente etiológico, descreveu o quadro histopatológico. Ele o caracterizou como processo inflamatório crônico com presença de células gigantes.

Outros autores do início do século apresentaram as alterações clínicas da doença, além de alterações histopatológicas. CARINI e PARANHOS (1909) descreveram as lesões como de aspecto esponjoso, coberto por uma crosta muito espessa, que quando destacada, deixava descoberta uma úlcera, de bordas desiguais, sinuosa e com o fundo cheio de tecido granuloso. Fora da região onde se achavam as úlceras, a pele se apresentava sã.

As lesões da mucosa nasal foram descritas por KLOTZ e LINDENBERG (1923) que caracterizaram diferentes estágios na evolução da doença. A lesão inicial seria o nódulo não ulcerado, com revestimento mucoso ainda íntegro. A seguir, ocorreria ulceração do epitélio. Nesta fase, eles referem à presença de células gigantes no infiltrado inflamatório. No terceiro momento, estaria presente também a necrose do tecido cartilaginoso do septo nasal.

MONTENEGRO (1924) chamou a atenção para a plasmocitose tecidual e definiu a resposta inflamatória na LTA como granumatulosa com presença de células gigantes. Relatou também a proliferação fibroblástica com deposição de colágeno na fase crônica da doença. Deu ênfase à escassez dos parasitas nas lesões antigas.

PESSÔA e BARRETO (1948) descreveram a histopatologia nas diferentes formas clínicas da doença, ressaltando as alterações teciduais, estruturais e com proliferação de fibras colágenas. Referiram riqueza dos parasitas em lesões ulceradas ativas recentes.

Outro tipo de resposta tecidual, caracterizada por macrófagos vacuolizados contendo em seu citoplasma numerosos organismos, “corpos leishmanióticos”, e por infiltrado leucocitário inespecífico composto por linfócitos e alguns neutrófilos é o que se observa na Leishmaniose Cutânea Disseminada (MARQUEZ, 1966), cujo quadro clínico se assemelha à Hanseníase Virchowiana. SILVA (1978) a denominou de Leishmaniose Anérgica Hansenóide.

AZULAY (1966) observou infiltrado dérmico constituído predominantemente por macrófagos e linfócitos, com algumas células epitelióides e raros parasitas.

Trabalhando na Venezuela, KERDEL-VEGAS e ESSENFELD-YAHR (1966) consideraram as alterações epidérmicas na LCA secundárias às alterações dérmicas constituídas por infiltrado inflamatório com formação de granulomas. Concluíram que a biópsia é importante para descartar outras

patologias, porém, o diagnóstico específico só pode ser firmado através do encontro do parasita nas lesões.

BRITO (1982) descreveu a histopatologia da LCA no Pará. Classificou o quadro morfológico em três grupos: grupo I, com a presença de parasitas nas lesões e resposta inflamatória crônica inespecífica; grupo II, com ausência de parasitas e resposta granulomatosa e grupo III, forma anérgica hansenóide com resposta exclusivamente macrofágica e acentuado parasitismo.

MAGALHÃES et al. (1986) caracterizaram a resposta tecidual da LCA como uma reação granulomatosa com necrose tecidual e infiltrado histiolinfoplasmocitário.

SAMADY e SCHWARTZ (1997) definiram a histopatologia da LCA no Novo Mundo, cujas características mais evidentes eram infiltrado de macrófagos, linfócitos e plasmócitos, além de células gigantes e granulomas com células epitelióides. Relataram, também, que a concentração de amastigotas na úlcera não depende apenas do tempo da lesão, mas também da espécie do parasita.

Para MEHREGAN et al. (1999), o infiltrado inflamatório é composto predominantemente por macrófagos, linfócitos e células gigantes multinucleadas. Em várias amostras plasmócitos foram observados, também, os “corpúsculos de Russel”.

SILVEIRA (2001) descreve a histopatologia da LCA em 06 pacientes portadores de infecção disseminada por *L. (L.) amazonensis*, em Belém, Estado do Pará. Os achados histopatológicos eram representados por



infiltrado denso, difuso, comprometendo toda derme; constituído, principalmente, por macrófagos vacuolizados, exibindo grande quantidade de amastigotas no interior dos vacúolos. Podiam ainda ser vistos, em proporção menor, grupos de linfócitos e de plasmócitos.

VELOZO et al. (2006) descreveram no exame histopatológico de uma criança do Distrito Federal, com leishmaniose cutânea mucosa, infiltrado inflamatório com granulomas contendo células epitelióides e gigantes, com necrose.

Os autores citados descreveram o quadro histopatológico da LCA, definindo-o como resposta inflamatória crônica, muitas vezes com formação de granulomas, mas o diagnóstico é determinado apenas com a demonstração do parasita.

#### **1.4 – Diagnóstico das Leishmanioses**

O diagnóstico da leishmaniose baseia-se em aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, onde, freqüentemente a associação desses elementos é necessária (FURTADO, 1980; GONTIJO e CARVALHO, 2003).

Os exames laboratoriais utilizados para o diagnóstico são:

1. pesquisa direta em raspado ou punção aspirativa da lesão,
2. cultivo em meio NNN bifásico *in vitro*;
3. inoculação *em hamster*;
4. sorologia por imunofluorescência, ELISA ou hemaglutinação direta,

5. Intradermorreação de Montenegro (IDRM)
6. biópsia de lesão para exame histopatológico, em material corado pela HE e reação imunohistoquímica,
7. reação da polimerase em cadeia, PCR, pode ser utilizada para diagnóstico e para identificação de algumas espécies.

#### **1.4.1 Pesquisa direta**

A pesquisa direta do parasita é um dos métodos mais utilizados para o diagnóstico da LCA (REED, 1996), já que é o encontro do parasita que firma o diagnóstico. Após a obtenção do material através de escarificação com estilete na superfície da lesão; raspado com lâmina de bisturi ou “punch”, ou realizando punção aspirativa, obtendo-se o esfregaço ou impressão por aposição em lâminas, que são coradas com Giemsa ou Leishman, para identificação das formas amastigotas do parasita (Ministério da Saúde/Brasil 2002). A vantagem da pesquisa direta do parasita é a sua simplicidade, porém seus resultados variam dependendo da quantidade de parasitas no material pesquisado e do treinamento do técnico para este diagnóstico.

SILVEIRA et al. (1999) observaram que de 1.082 pacientes atendidos na Universidade Estadual de Maringá - PR, 453 foram positivos para a pesquisa direta do parasita e 629 apresentaram resultado negativo.

Em pacientes atendidos no Hospital Universitário de Brasília, o percentual de positividade através do esfregaço foi de 47,5% (NANE 2005).

#### 1.4.2 Cultivo “in vitro”

O meio mais utilizado é o ágar sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle – NNN. O crescimento do parasita ocorre entre uma e duas semanas, e formas promastigotas podem ser visualizadas ao microscópio óptico (SALMAN et al., 1999).

A positividade é bastante variável. Na literatura há relatos de valores distintos, variando de 20% (BERMAN, 1997), 35,8% (PASSOS et al., 1999), a até 65% (DEPS, 1998).

No loteamento “Morada das Águias”, na encosta da Serra da Tiririca, no Município de Maricá, Estado do Rio de Janeiro, foi realizada a cultura no meio NNN, em 16 fragmentos de cães com LCA, sendo obtido o isolamento de *Leishmania* em 11 (SERRA, 2003).

O isolamento da *Leishmania* em cultura é variável, em torno de 20 a 40%. Esta baixa sensibilidade está relacionada a aspectos da técnica de isolamento, à escassez do parasita nas lesões, particularmente nos casos de *L. (V.) braziliensis*, e, também, à freqüente contaminação do meio com fungos e bactérias (RODRÍGUEZ et al., 1994; RAMOS-e-SILVA e JACQUES, 2002).

#### 1.4.3 Inoculação em “hamster”

Outro método de isolamento de *Leishmania* para confirmação diagnóstica é a inoculação de aspirado ou fragmento de biópsia em hamster. O material obtido deverá ser macerado e diluído em solução salina estéril. O

material homogeneizado é injetado, preferencialmente, nas patas posteriores (GENARO, 2000).

Além do longo tempo necessário para a evolução da lesão no animal (02 a 09 meses em média) a eficácia do isolamento apresenta grande variação conforme a espécie de *Leishmania* (GONTIJO et al., 2003).

O tempo de crescimento do parasita é lento, o que dificulta a utilização deste método, praticamente inviabilizando sua utilização na prática clínica, sendo utilizado apenas para pesquisa (SALMAN et al., 1999).

#### **1.4.4 Sorologia por imunofluorescência, ELISA ou aglutinação direta**

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

Os métodos sorológicos são mais úteis para detectar anticorpos na Leishmaniose Visceral, onde os níveis de anticorpos são significativamente superiores aos níveis encontrados na Leishmaniose Cutânea (MENDONÇA et al., 1988; WALTON et al., 1972).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é muito utilizada em estudos sobre leishmanioses envolvendo população humana ou canina (MARZOCKI et al., 1980; GOMES et al., 1990; SAN MARTIN-SAVANI, 1998) e pode auxiliar, sobretudo, em casos nos quais não é possível encontrar o protozoário (MENDONÇA et al., 1988).

No Hospital Universitário de Brasília, o percentual de positividade foi de 67,6% para a imunofluorescência indireta (NAME et al., 2005) e no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto - SP, o índice de positividade foi de 59,7% (GARCIA, 2005).

A hemaglutinação direta assim como a imunofluorescência indireta, utilizam antígenos de promastigotas inteiras, o que limita a especificidade dos testes e problemas para sua padronização (REED, 1996).

Os testes imunoenzimáticos (ELISA) geralmente utilizam parasitas lisados, que se acredita possam aumentar a exposição de moléculas de antígenos. Entretanto, sua sensibilidade é de 67% a 76%, não sendo utilizada rotineiramente para o diagnóstico da LCA (BERMAN, 1997).

O papel dos testes sorológicos é limitado, podendo ser empregado na evolução da doença durante e após o tratamento (RAMOS-e-SILVA e JACQUES, 2002).

#### **1.4.5 Intradermorreação de Montenegro (IDRM)**

O teste consiste na injeção de uma suspensão de antígeno, preparado com formas promastigotas, na face anterior do antebraço, para a indução da resposta de hipersensibilidade tardia, e a reação é lida após 48 a 72 horas (SALMAN et al., 1999). É considerado positivo quando ocorre formação de halo de endurecimento com diâmetro maior ou igual a 05 mm (DA-CRUZ e AZEREDO COUTINHO, 2001).

Este teste é útil nos inquéritos epidemiológicos de áreas endêmicas, porém, não distingue infecções passadas de atuais (DA-CRUZ e AZEREDO COUTINHO, 2001).

A positividade da IDRM em paciente com LCA fica em torno de 90% (GREVELINK e LERNER, 1996), outros relatos encontrados na literatura apresentam variações como de 96% (NAME et al., 2005), 73,4% (GARCIA et al., 2005), 100% (ANDRADE et al., 2005), 96% (MACHADO et al., 2002).

Na área rural do Município de Varzelândia, nordeste de Minas Gerais, 59,6% de casos com lesões cicatriciais apresentaram IDRM positiva (NUNES et al., 2006).

A IDRM não pode ser utilizada para seguimento evolutivo da LCA, porque continua positiva mesmo após tratamento. A reação de Montenegro continua sendo importante no diagnóstico de lesões mais antigas onde a presença do parasita é mais rara (RAMOS-e-SILVA e JACQUES, 2002).

#### **1.4.6 Biópsia: histopatologia e imunohistoquímica**

O diagnóstico histopatológico é feito baseado nas características do infiltrado inflamatório, mas é a identificação do parasita que confirma o diagnóstico. A coloração mais usada é hematoxilina e eosina (HE).

A positividade em biópsias coradas pela HE tem mostrado resultados variados. GARCIA (2005) encontrou positividade de apenas 30,6% no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - SP. Em pacientes atendidos no Hospital Universitário de Brasília – DF, a identificação do parasita foi de 20,4% dos casos (NAME et al., 2005). No

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ, foi encontrado 35,4% de positividade (FERNANDES et al., 2004).

ALESSI (2003) identificou 56,82% de casos positivos pela hematoxilina-eosina no Pontal do Paranapanema, Estado de São Paulo.

Quando o infiltrado inflamatório é granulomatoso, é comum a diminuição do número de parasitas identificados nas lesões, sendo difícil seu achado em lesões antigas. No entanto, a identificação de parasitas é fundamental para o diagnóstico histopatológico.

Para melhorar o diagnóstico etiológico da LCA, mesmo quando há escassez das formas amastigotas nos tecidos, diversas técnicas têm sido desenvolvidas em laboratórios. Nos últimos dez anos, os métodos imunohistoquímicos (IH), que utilizam anticorpos mono e policlonais, têm possibilitado maior precisão no encontro dos parasitas em tecidos.

A técnica imunohistoquímica baseia-se na identificação de proteína específica, antígeno, na qual o anticorpo se liga e é reconhecido por um anticorpo secundário, ao qual se liga o complexo enzimático da streptavidina-biotina-peroxidase. A peroxidase transforma uma substância cromogênica, a diaminobenzidina, que confere à reação positiva uma coloração acastanhada.

Em pacientes procedentes da região amazônica, o índice de positividade do método de IH com anticorpo policlonal foi de 50% (PENELA, 2001), no Pontal do Paranapanema, São Paulo foi de 68,18% (ALESSI, 2003).

O diagnóstico específico é de extrema relevância, podendo interferir na avaliação terapêutica e no prognóstico, assim como nos métodos de controle da doença (GRIMALDI et al., 1989; ESCOBAR et al., 2002).

#### **1.4.7 PCR**

Técnicas baseadas em análise de DNA estão sendo cada vez mais utilizadas no diagnóstico e caracterização de espécies de *Leishmania* (SALMAN et al., 1999). Uma das vantagens das técnicas de diagnóstico molecular é a possibilidade de aplicação mesmo quando dispomos de pequenas amostras de material ou amostras estocadas.

A PCR reproduz laboratorialmente o processo de replicação natural de DNA, o que é possível devido à descoberta do *Thermus aquaticus*, uma espécie de bactéria que sobrevive em altas temperaturas em termas naturais. Desta bactéria, extrai-se uma DNA polimerase, capaz de resistir aos agressivos ciclos térmicos usados durante a realização da PCR (ANDRADE, 1993). A síntese enzimática utiliza além da Taq DNA polimerase, iniciadores específicos (primers) e deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs).

A PCR se dá em três fases: desnaturação, anelamento ou hibridização, e extensão ou polimerização. Na desnaturação, ocorre a separação da fita dupla do DNA em duas fitas únicas, promovida por elevação da temperatura em graus variáveis, entre 90 e 95 graus. Na segunda fase, anelamento, ocorre a demarcação das extremidades do DNA de interesse, nas duas fitas resultantes da fase anterior, utilizando um pequeno fragmento de DNA



chamado “primer”, que é sintetizado “in vitro” a partir de uma seqüência de oligonucleotídeos previamente conhecida. Na polimerização, a Taq DNA polimerase liga os nucleotídeos entre si, completando a fita simples, e transformando-a em dupla, promovendo sua extensão. A partir daí ocorre uma reação em cadeia, sendo que os fragmentos de DNA recém-formados fornecem mais moldes para a montagem de novas fitas nos ciclos subseqüentes (ANDRADE, 1993). Atualmente este procedimento é totalmente automatizado, quando se utiliza o termociclador, programado para ajustar tempo, temperatura e número de ciclos específicos para o objetivo que se pretende alcançar. O amplificado produzido pela reação pode ser analisado por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida.

Diversos alvos têm sido utilizados para a detecção desse parasita, dentre eles: rDNA (DE BRUIJN e BARKER, 1992; LOPEZ et al., 1993), rDNA, que possui várias cópias e são altamente conservados (ULIANA et al., 1994) e mais recentemente o gene da glucose-6-fosfatase desidrogenase (G6PD) de cópia única que identifica subgênero *Viannia* e diferencia *Leishmania (V.) braziliensis* das demais espécies (CASTILHO et al., 2003).

Em pacientes do Hospital Universitário de Ribeirão Preto, São Paulo, a PCR foi positiva em 81,5% dos casos, tendo como alvo o rDNA de *L. mexicana* (Medeiros et al.; 2002). GARCIA et al. (2005) utilizaram primers específicos para seqüência de 120pb do rDNA do minicírculo, e observaram 81,6% de amostras positivas.

SAN MARTIN-SAVANI et al. (2005) usaram como seqüência alvo da PCR uma região do DNA ribossômico (rDNA) que codifica a subunidade

menor do ribossomo (SSU), conforme descrito por ULIANA et al. (1994), para verificar a espécie de *Leishmania* que ocorria em cães no Estado do Mato Grosso do Sul. O produto da “nested” – PCR permitiu a identificação da *Leishmania*. (*Leishmania*) *chagasi*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e *Leishmania* (*Viannia*).

Presença de substâncias inibidoras de amplificação na amostra e “dificuldades” na extração pode levar a resultados falso-negativos. Outra causa de falso-negativos é a escolha do “primer” com grande concentração dos pares de nucleotídeos guanina-citosina (GC, maior que 50%), uma vez que sua ligação se dá por ponte tripla de hidrogênio, o que caracteriza uma ligação mais forte, e, portanto, mais difícil de sofrer o processo de desnaturação, reduzindo a possibilidade de hibridização, com conseqüente redução do rendimento do produto da PCR (HIRATA e HIRATA, 1997).

A PCR em material incluído em parafina também tem sido avaliada, tendo sido detectado rDNA em 53% de pacientes com diagnóstico de LC, confirmado por cultura, e 48% de casos suspeitos de leishmaniose lupóide, podendo os casos falso-negativos serem atribuídos à baixa concentração de amastigotas no material, ou perda de DNA durante extração da parafina (WEIGLE et al., 2002).

A PCR encontra-se em desenvolvimento, com inovações freqüentes. A análise molecular da *Leishmania* tem sido alvo de diversos estudos no mundo inteiro, com aplicações práticas no diagnóstico, monitoramento do tratamento e prevenção (FLOETER-WINTER e ULIANA, 1993).

**AS LEISHMANIOSES NO ESTADO DE SÃO  
PAULO, COM ÊNFASE NO PONTAL DO  
PARANAPANEMA E O MST**

---

## **2 AS LEISHMANIOSES NO ESTADO DE SÃO PAULO, COM ÊNFASE NO PONTAL DO PARANAPANEMA E O MST**

Em meados do século XIX surgiram no Pontal do Paranapanema os primeiros imigrantes de Minas Gerais para desbravamento desse sertão. Após a decadência do ciclo mineiro, eles foram atraídos pelas terras de pastagens, apropriados à criação de animais. As notícias de existência de terras desocupadas nessa região e a possibilidade de rápido enriquecimento foram os atrativos para se iniciar o povoamento da região (BARBOSA, 1990).

Estas condições deram início à ocupação irregular da região por posseiros e grileiros. Os posseiros são trabalhadores que ocupam um pedaço de terra suficiente para a produção para sua família, é um lavrador pobre. Seu excedente é vendido com o objetivo de complementar as necessidades da família camponesa. Não pode ser caracterizado como invasor de propriedade, pois, a rigor, não expulsa nenhum proprietário. O grileiro é o homem que sabe que a terra não lhe pertence e usa de meios escusos para obter o título de propriedade. Seu objetivo é comercializar os títulos de terras depois de conseguir oficializá-los, tornando-se um autêntico traficante de terras (ALMEIDA, 1996).

Posteriormente, com a vinda do café, imigrantes italianos vieram trabalhar na lavoura existente no Pontal. Em 1895, BREDA apud SILVEIRA, (1919) relata as primeiras descrições da LCA no Estado de São Paulo,

identificada em italianos que de São Paulo, voltaram para a Itália. Dentre esses doentes, quinze eram do sexo masculino, havendo apenas uma mulher. A maioria havia adoecido entre os meses de setembro e dezembro e todos trabalhavam no cultivo de café.

A colonização da região do Pontal se consolidou em 1905, com a construção da estrada de ferro Noroeste do Brasil, que ligaria Bauru, no Estado de São Paulo, a Porto Esperança em Mato Grosso.

Em 1908, surge a “úlceras de Bauru”, originando uma epidemia de LCA entre os operários da estrada de ferro. Esses doentes vinham buscar assistência médica na capital e os clínicos do serviço sanitário da época, seguiram para a região oeste. Os doutores Emílio Ribas, Adolpho Lutz e Octávio Machado observaram na área numerosos casos de doentes com úlceras semelhantes ao clássico “botão do Oriente”, que ocorria no Velho Mundo (LINDENBERG, 1909). Estas investigações resultaram em um relatório que foi apresentado ao Instituto Bacteriológico, em 1908.

*Foram feitos muitos estudos bacteriológicos em muitos casos de feridas crônicas observadas neste Estado, principalmente na zona Oeste. As feridas correspondem a certas descrições de úlceras patogênicas dos países quentes, não se limitam às extremidades inferiores, mas observam-se também nas superiores e até na cabeça, onde às vezes, as mucosas participam do processo inflamatório e ulcerativo. Não podemos deixar de notar que há*

*analogia em vários sentidos entre as ocorrências destas úlceras e os casos de blastomicose americana que se observa tanto nas mucosas como na pele na mesma região e às vezes nos mesmos indivíduos.*

Porém, apenas em 30 de março de 1909 o jornal “Estado de São Paulo” informou que o Dr. Adolpho Lindenberg, encontrara um parasita que julgou ser o causador da úlcera de Bauru, semelhante ao descoberto pelo Dr. Wright, no “botão do Oriente”, moléstia observada principalmente no Egito.

Simultaneamente, os Drs. Carini e Paranhos também isolaram um protozoário que coravam pelo método de Giemsa e Leishmann semelhante ao “botão do Oriente”.

Com estas informações estava resolvida, em trabalho nacional, publicado na “Revista Médica”, a questão da etiologia das úlceras de Bauru no oeste do Estado (CARINI e PARANHOS, 1909).

SILVEIRA (1919) publicou o primeiro estudo sobre a distribuição da doença no Estado, a partir de pacientes atendidos na Santa Casa de São Paulo, mostrando que os casos ocorriam inicialmente na zona percorrida pela estrada de ferro Noroeste, posteriormente na região da Alta Sorocabana e Alta Paulista, áreas de desmatamento e de plantação de café que correspondem atualmente ao Pontal do Paranapanema.

Concomitantemente a estes fatos, os descendentes do Coronel Manoel Goulart, que possuía aproximadamente 90.000 alqueires no Pontal, retalharam as terras em sítios e fazendas, e com isso o Pontal ia sendo

lentamente ocupado e grilado. Outros dois terços das terras continuavam em propriedade do Coronel Marcondes que, até 1935, não havia feito nenhuma venda de terra (LEITE, 1981).

Em 1936, o Coronel Marcondes vende suas terras para a Companhia Imobiliária e Agrícola Sul-americana, com sede na cidade do Rio de Janeiro, cujo proprietário era o próprio Marcondes. Neste mesmo ano, a Companhia Agrícola Sul-americana efetua a venda de terras, cujo valor e especulação haviam aumentado.

Os jornais de São Paulo publicavam anúncios de vendas de terras férteis no extremo oeste do Estado. Com essas vendas, também se multiplicavam as invasões em terras desocupadas (BARBOSA, 1990).

Neste mesmo período, BARBOSA (1936) estudando casos de leishmaniose na região com comprometimento de mucosa, em pacientes atendidos no ambulatório de Otorrinolaringologia da Santa Casa de São Paulo, mostrou que o maior número de casos ocorreu nos anos de 1916 e 1927, quando a Alta Sorocabana foi aberta.

O Governador Fernando Costa criou, em 1941 e 1942, três reservas florestais: a Reserva do Morro do Diabo – em Teodoro Sampaio; a Reserva da Lagoa São Paulo – em Presidente Epitácio; e a Grande Reserva do Pontal – delimitada pelo Rio Paraná.

Contudo, essa medida pouco ou nenhum efeito produziu sobre os aventureiros; para eles pouco importava se as terras eram grilo, posse, devolutas, particulares ou não. Desta forma, as reservas do Pontal do Paranapanema foram sendo ocupadas e devastadas. Cabe destacar que

hoje a única reserva que resta no Pontal é o Parque Estadual do Morro do Diabo, com 36.000 hectares (Figura 1).



Figura 1: Vista Parcial do Parque Estadual Morro do Diabo

Com o objetivo de se conhecer a disseminação da LCA no Estado de São Paulo, PESSÔA e BARRETTO (1948) classificaram o Pontal em duas regiões:

1. Regiões de Alta Endemicidade: Alta Paulista, a partir de Marília; Alta Sorocabana, a partir de Presidente Prudente, e Noroeste, a partir de Araçatuba, estendendo-se até o Rio Paraná e limitados a norte e sul pelos Rios Tietê e Paranapanema, respectivamente.
2. Regiões de casos esporádicos da doença ou onde a doença é desconhecida: restante do Estado.

Os autores da época consideravam que uma vez assentada a população, cessada a derrubada de matas com redução importante das



áreas de floresta, haveria o desaparecimento de novos casos de LCA. Supunha-se que a LCA figurava apenas nas estatísticas médicas como uma doença que incidiu durante a conquista do oeste paulista, desaparecendo depois definitivamente (SAMPAIO, 1951).

Depois da devastação da cobertura florestal primitiva no Pontal, houve redução na notificação de Leishmaniose Cutânea Americana para casos esporádicos, perdendo sua importância como problema de Saúde Pública no Estado.

A partir da década de 50, o Estado sofre novo processo de intenso desmatamento para atender a expansão agropecuária, particularmente no Pontal do Paranapanema.

Novas feições paisagísticas se estabeleceram, levando a novos ciclos e à permanência de casos esporádicos da LCA no Pontal.

Como o processo de ocupação no Pontal sempre teve historicamente a forma clássica de ocupação dos grileiros, não foi difícil para os trabalhadores, bóias-frias e posseiros da década de 80 ocuparem fazendas da região e serem despejados após alguns dias de ocupação.

Em março de 1984, o governador assinou os primeiros decretos de desapropriação de uma área de 15.110 hectares para assentar as famílias acampadas na rodovia SP613. Esses decretos acirraram os ânimos dos grileiros do Pontal que declaram guerra ao governo estadual invadindo a reserva florestal do Morro do Diabo.

A partir deste período, novos casos da LCA foram notificados, cuja transmissão foi identificada como devida a fatores antrópicos, além da

conhecida transmissão através de grandes ecossistemas florestais. Nessa nova feição da doença, há uma transição do perfil epidemiológico, ampliando a autoctonia dos casos, com aproximadamente 25% dos Municípios do Estado apresentando ao menos a notificação de um caso (GOMES e CAMARGO, 1998).

O MST, como movimento organizado, realizou sua primeira ocupação na região do Pontal do Paranapanema no dia 14 de julho de 1990. Nesse dia, 700 famílias ocuparam a fazenda Nova Pontal no Município de Teodoro Sampaio/SP. No dia 21 de julho, por uma operação que envolveu 900 policiais das polícias militar e civil, além da artilharia de elite, as 700 famílias foram despejadas.

Os trabalhadores acamparam nas margens da rodovia SP613 e em áreas marginais no entorno do Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD) e de fragmentos florestais. A reserva do PEMD e as pequenas “ilhas” florestais são agredidas sempre que ocorre uma grande ocupação com posterior despejo das famílias. Sem lugar para ficar, as famílias despejadas procuram estas áreas florestais para acampar.

Hoje, são mais de seis mil famílias assentadas, cerca de 20 mil pessoas. E ainda existe no Pontal cerca de 1.300 famílias acampadas (Santos, 2006).

Os militantes do MST, ao acamparem próxima às matas, estabeleceram um novo ciclo de transmissão da LCA. A construção desses acampamentos, inclusive na margem da rodovia, provoca um desequilíbrio do habitat natural de muitos animais silvestres e, talvez, atraindo outros para a região. Isto leva certamente a alterações na fauna flebotomínea, expondo os acampados a

duplo risco de adquirir a LCA: o fato de estarem na margem da mata e quando entram na mata para explorá-la.

Atualmente, os integrantes do MST, ainda continuam invadindo fazendas na região. No último dia 05 de dezembro de 2006, as fazendas Guarani, em Presidente Bernardes, e Santa Tereza, em Euclides da Cunha, foram invadidas. Com essa invasão, já são dez fazendas invadidas na região, desde o segundo turno das eleições.

*“Nós nunca vamos dar trégua para nenhum dos governos, seja estadual seja federal”* disse o coordenador estadual do MST, Valmir Ulisses Sebastião.

Só no ano de 2006 o Pontal já foi palco de 49 invasões de fazendas, conforme indica o levantamento do Instituto de Terras do Estado de São Paulo (ITESP).

A LCA permanece na região e a forma clássica de transmissão ainda persiste nos dias atuais. A fim de explicar essa situação, justifica-se o desenvolvimento de um estudo sobre a leishmaniose no Pontal, para fornecer subsídios aos responsáveis pelas ações de saúde local e alertar as autoridades responsáveis pelo turismo e assentamentos dos trabalhadores rurais sem terra sobre os riscos da LCA no Pontal.

## **OBJETIVOS**

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- Estudo dos aspectos epidemiológicos, clínicos e histopatológicos da leishmaniose cutânea no Pontal do Paranapanema.
- Utilizar método de diagnóstico molecular que possibilite identificar o agente etiológico e a caracterização do gênero, subgênero e a espécie de *Leishmania* presentes na região.

#### 3.2 Específicos

- Analisar a distribuição da LCA na população do Pontal do Paranapanema, segundo idade, sexo e ocupação;
- Identificar as formas clínicas da doença caracterizando as lesões do ponto de vista clínico e histopatológico;
- Identificar o parasita na lesão pela histopatologia, imunohistoquímica e PCR;
- Avaliar e comparar a técnica de PCR, HE e imunohistoquímica no diagnóstico da LCA, utilizando-se amostras de tecidos emblocados em parafina e estocados nos laboratórios da região;
- Avaliar a possibilidade de utilizar os ensaios da PCR em amostras clínicas na região do Pontal do Paranapanema – SP.

- **MATERIAL E MÉTODOS**

---

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Descrição da Área de Estudo**

#### **4.1.1 Aspectos Gerais**

##### **4.1.1.1 Geomorfologia**

A área do território paulista denominada Pontal do Paranapanema situa-se no extremo sudoeste do Estado de São Paulo, é delimitada pelo Rio Paraná, na fronteira com o Estado do Mato Grosso do Sul, e pelo rio Paranapanema, na fronteira com o Estado do Paraná. O Pontal tem área de 8.936 km<sup>2</sup>, é constituído pelos seguintes Municípios: Teodoro Sampaio, Rosana, Euclides da Cunha, Mirante do Paranapanema, Sandovalina, Pirapozinho, Narandiba, Taciba, Presidente Epitácio, Marabá Paulista, Santo Anastácio, Caiuá, Presidente Venceslau, Piquerobi, Presidente Bernardes, Álvares Machado, Presidente Prudente, Martinópolis, Indiana, Estrela do Norte, Tarabai, Anhumas, Regente Feijó, Alfredo Marcondes, Caiabú, Santo Expedito, Emilianópolis e Ribeirão dos Índios (Figura 2).

O Pontal do Paranapanema é parte integrante da chamada região da Alta Sorocabana que, por sua vez, integra o Planalto Paulista. Relevo regular, em ondas de colinas suaves, compondo espigões areníticos mesozóicos. A marcante característica física do Pontal é dada pelo aparecimento do arenito-caiuá cujas formas de relevo assemelham-se às oriundas do arenito-bauru, em que a monotonia é quebrada apenas pelo aparecimento do denominado “Morro do Diabo” (415m de altitude) no

#### 4. Material e Métodos

Município de Teodoro Sampaio. À margem esquerda do Rio Paranapanema, surgem igualmente os testemunhos do antigo relevo, com as elevações denominadas “Três Morrinhos”.



Figura 2: Distritos do Pontal do Paranapanema, São Paulo, Brasil

O que deve ficar caracterizado fisicamente no Pontal é que o referido arenito-caiuá deu origem ao solo, conhecido na área como terra mista, de cor avermelhada, fortemente arenoso.

O Rio Paraná, formado pela confluência dos Rios Paranaíba e Grande, é o segundo rio em extensão na América do Sul e o décimo do mundo em vazão. Sua bacia abrange mais de 10% do território nacional; e um dos maiores afluentes é o Rio Paranapanema, cujo nome na língua Tupi, significa rio ruim, ou água ruim, talvez se referindo à pesca de peixes.



O clima do Pontal do Paranapanema apresenta características de transitoriedade entre o Tropical, que domina a maior parte do Pontal, e o subtropical, típico do interior da Região Sul do Brasil.

As temperaturas médias, nos meses mais frios, oscilam entre os 15°C e os 20°C, e a pluviosidade tem se mantido entre os 1.100 e 1.300 mm anuais. No Brasil, este clima costuma ser denominado de peritropical.

Assim, as calhas dos rios Paraná e Paranapanema são passagens naturais das massas temperadas oriundas do Sul do Continente. Contudo, há nítido predomínio anual das frentes tropicais na área, não sendo raras as temperaturas que se aproximam dos 40°C.

A topografia suave, a boa distribuição de chuvas durante o ano e as temperaturas médias anuais elevadas são elementos indispensáveis ao estabelecimento no Pontal de exuberante cobertura vegetal, de tipo arbóreo, com espécies latifoliadas.

#### **4.1.1.2 Economia:**

A região possui como atividade principal a agropecuária. Destacam-se as culturas do milho, feijão, mandioca, cana-de-açúcar e algodão, além da pecuária de corte e leite. O Pontal ainda está relacionado com a fabricação de tijolos e telhas de argila.

#### **4.1.1.3 Movimentos Sociais no Pontal do Paranapanema.**

O processo de expansão da luta pela terra, executada pelo MST no Pontal, causou um importante impacto sócio-territorial na região. Um dos

---

 4. Material e Métodos
 

---

indicadores desse impacto é o crescimento populacional e casos esporádicos de LCA.

Segundo o último relatório realizado pelo DATALUTA em 2004, os municípios do estado de São Paulo com maior número de ocupações estão localizados no Pontal do Paranapanema (Tabela 1).

Tabela 1: São Paulo - municípios com maior número de ocupações 1990 – 2004.

<b>Municípios</b>	<b>Nº Ocupações</b>	<b>Nº Famílias</b>
<b>1º</b> Mirante do Paranapanema	129	26.206
<b>2º</b> Presidente Epitácio	38	4.198
<b>3º</b> Teodoro Sampaio	34	8.204
<b>4º</b> Euclides da Cunha Paulista	29	9.950
<b>5º</b> Sandovalina	26	11.878
<b>6º</b> Caiuá	25	2.050
<b>7º</b> Martinópolis	24	1.336
<b>8º</b> Rancharia	22	4.706
<b>9º</b> Presidente Venceslau	20	4.110
<b>10º</b> Presidente Bernardes	16	2.254
<b>11º</b> Rosana	15	1.334
<b>12º</b> Castilho	12	1.757
<b>13º</b> Iaras	12	2.088
<b>14º</b> Marabá Paulista	9	1.630
<b>15º</b> Itapeva	9	920
<b>16º</b> Andradina	8	944
<b>17º</b> Colina	8	1.480
<b>18º</b> Getulina	7	4.800
<b>19º</b> Taubaté	7	740
<b>20º</b> Guarantã	6	495
<b>21º</b> Paulicéia	6	1.570
<b>22º</b> Tremembé	6	615
<b>23º</b> Santo Anastácio	6	1.100

Fonte: DATALUTA – Banco de Dados da Luta Pela Terra,

### 4.1.2 Características Locais

No final da década de 30, foi criado o Primeiro Parque Estadual do Pontal do Paranapanema, destinado a conservação da fauna e flora, e ficou conhecida como Reserva Florestal do Morro do Diabo; para proteger 247 mil hectares de florestas. Porém, nos anos seguintes, essa unidade de conservação foi submetida a um intenso processo de fragmentação e destruição florestal associado aos conflitos fundiários e ocupações irregulares de terras.

Em junho de 1986, para frear o rápido processo de degradação, foi criado o PEMD – Parque Estadual Morro do Diabo (Figura 3), originado da Reserva com o mesmo nome.

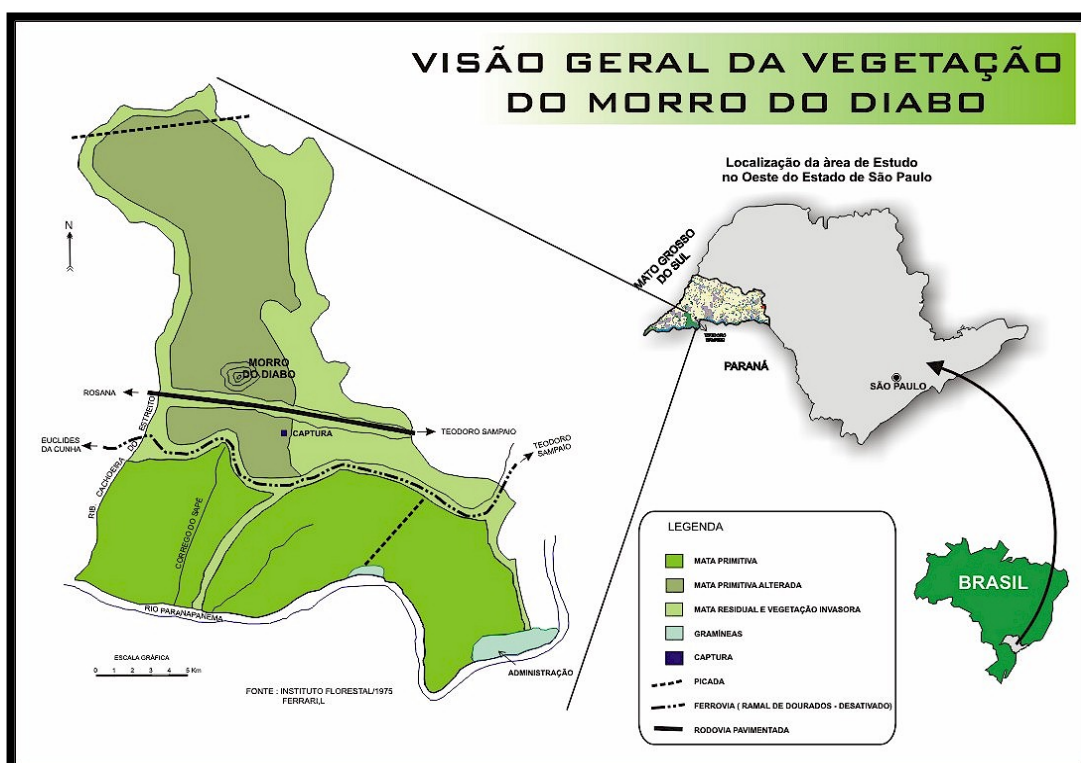


Figura 3: Visão geral da vegetação do Morro do Diabo

O PEMD está localizado a 12 km do município de Teodoro Sampaio (22°30'L.S. e 52°20'L.W.). Apresenta mata com característica de floresta latifoliada tropical semidessídua e altitude média de 350 m.

O Parque possui grande variedade de espécies animais e vegetais. Devido ao desrespeito aos limites da reserva, suas matas ficaram reduzidas a 36 mil hectares e o ponto mais alto é o morro testemunho denominado “Morro do Diabo” com 350 metros de altura. Atualmente, há 12 mil hectares de fragmentos de matas espalhados na região.

Na busca por "Um Pontal Bom Para Todos", nome do programa de educação ambiental do Instituto de Pesquisas Ecológicas (IPE), reuniões participativas fazem parte das estratégias de integração dos diferentes segmentos sociais. As Eco-Negociações (como essas reuniões são chamadas) conseguem reunir o prefeito, os fazendeiros, os representantes do comércio e as lideranças, incluindo até assentados e educadores para juntos discutirem problemas, potenciais, riscos e oportunidades de mudanças.

*“O Pontal pode vir a se tornar um modelo de desenvolvimento sustentável, que contemple prioridades sociais e ambientais sem perder de vista os objetivos específicos de cada grupo”, diz a presidente do IPE, Suzana Pádua.*

## **4.2 Inquérito Humano**

O reconhecimento dos Municípios foi feito com o auxílio de mapas do IBGE e de contatos com as lideranças locais.

### **4.2.1 População Estudada**

Este trabalho realizou um estudo sobre a Leishmaniose no Pontal do Paranapanema utilizando informações do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para onde são encaminhadas as notificações dos casos. No período de 1995 a 2004 foram notificados 148 casos de leishmaniose cutânea no Pontal do Paranapanema, registrados em boletim padronizado pelo Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) - "Ficha de Investigação de Leishmaniose tegumentar americana" (Anexo 1). Destes, 78 foram selecionados para o presente trabalho obedecendo aos seguintes critérios de inclusão: presença da biópsia, identificação completa, origem, número das lesões e forma clínica (Anexo 2).

No caso de hipótese de diagnóstico de leishmaniose, os pacientes assinaram termo de autorização para colheita de material, para o processamento de técnicas laboratoriais para confirmação do diagnóstico. Este estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Lesões cutâneas compatíveis com leishmaniose cutânea foram biopsiadas. Após a realização da anti-sepsia com álcool e água oxigenada, utilizou-se um punch de 04 mm de diâmetro, para a retirada de fragmentos da borda das lesões.

O fragmento foi colocado em formol 10% e encaminhado ao laboratório de Anatomia Patológica e Citopatológica de Presidente Prudente – SP para processamento através do método emblocamento em parafina e as lâminas coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE). Cortes de material parafinado foram utilizados, também, para imunohistoquímica (IH).

Para detecção de DNA do parasita por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e identificação das espécies com o emprego da técnica de seqüenciamento, foram utilizadas amostras incluídas em parafina. Os procedimentos da técnica molecular foram realizados no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB/USP).

Os doentes estudados tiveram diagnóstico conclusivo de leishmaniose, receberam tratamento específico junto à Unidade Básica de Saúde (UBS) ou Programa de Saúde da Família (PSF) da região.

### **4.3 Metodologia dos exames de laboratório**

#### **4.3.1 Identificação do Parasita nas lâminas coradas pela HE**

As biópsias, retiradas assepticamente das bordas das lesões cutâneas, foram fixadas em formol 10%, incluídas em parafina e seccionadas em cortes semi-seriados na espessura de 3µm, por meio de micrótomo rotativo.

Os cortes foram corados pelo método da HE e examinados em microscópio óptico utilizando-se a objetiva de 40X. Os aspectos histopatológicos observados foram: presença ou ausência de granuloma, necrose, plasmócitos, células-gigantes e presença ou ausência de parasita.

#### **4.3.2 Identificação do Parasita pela imunohistoquímica**

Utilizou-se a técnica da Avidina-Biotina (LSAB-DAKO®).

O material da biópsia foi montado em cortes de 3µm, desidratado em xilol a 60°C por 15 minutos e reidratado por uma bateria com concentração decrescente de álcool.

Para a recuperação antigênica, os cortes foram colocados em panela de pressão com tampão citrato por 3 minutos, após o início da pressão em pH=6,0.

Procedeu-se a incubação do material numa solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 30 minutos (3 trocas). Em seguida, a incubação foi feita em peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 30 minutos (3 trocas) para bloquear a peroxidase endógena tecidual. Para bloqueio de reações inespecíficas de fundo, o material foi incubado em soro fetal bovino a 2% por 60 minutos (37°C).

Após esta etapa, desprezou-se apenas o soro e o material foi tratado com leite *Molico* desnatado por 30 minutos.

Os cortes foram, em seguida, tratados com o anticorpo primário policlonal. O anticorpo foi produzido no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São

Paulo, LIM/50, obtido através da inoculação de  $10^7$  formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (cepa EPM) no coxim plantar traseiro de camundongos susceptíveis BALB/c. Foram realizadas sangrias periódicas pelo seio retro-ocular para o acompanhamento dos títulos de anticorpos por imunofluorescência indireta. Após 75 dias de infecção, os animais foram sacrificados e o sangue coletado, também, por punção do seio retro-ocular. O soro, obtido após a centrifugação foi glicerinado, volume a volume, e estocado a 20°C até o seu uso.

O material foi exposto à ação do anticorpo primário por 60 minutos em câmara úmida (37°C) e depois deixado “over-night” a 4°C.

Os cortes foram então lavados em PBS com 0,5 % de Tween por 30 minutos (6 trocas). Após as lavagens em PBS, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário biotilado por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão PBS por 30 minutos (6 trocas).

Posteriormente, o material foi incubado com o complexo streptavidina-avidina-biotina por 30 minutos a 37°C em câmara úmida e, em seguida, lavados em tampão PBS por 30 minutos (6 trocas).

A revelação da reação foi realizada com diaminobenzidina, DAB, (Sigma Chemical<sup>®</sup>) 40 mg em PBS pH 7,2 adicionando-se 2ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 10 volumes, imediatamente antes do uso por cerca de 3 minutos e, depois, lavado em água.



Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris, lavados, desidratados em cadeia crescente de álcool e xilol e montados com Entellan (MERCK).

Para que não se soltassem das lâminas, os cortes foram capturados em lâminas com organo-silano.

### **4.3.3 Controles**

Foram utilizados como controles negativos fragmentos de pele de cão normal obtida de retalhos cutâneos de cirurgia.

Biópsias de linfonodos de cães com Leishmaniose Visceral, onde as abundantes formas parasitárias foram coradas pela reação, foram utilizadas como controle positivo.

### **4.3.4 Identificação do parasita através da reação em cadeia da polimerase**

#### **4.3.4.1 Extração de DNA em blocos de parafina**

As amostras foram obtidas a partir de blocos de parafina contendo fragmentos do tecido, obtidos de biópsias.

Com o auxílio de navalha histológica descartável, foram obtidos 30 mg a 40 mg de material. Este material foi transferido para um microtubo (eppendorff) de 1.500 µl e submetido, por três vezes, a um banho de 1.000 µl de xilol pré-aquecido em banho seco a 95°C; por 30 minutos a 37°C,

centrifugado por cinco minutos à temperatura ambiente, a 13.000 RPM, descartando-se o sobrenadante.

Após a desparafinização foi retirado todo o xilol através de duas lavagens com 500µl de etanol absoluto. Em cada uma destas lavagens, o material foi centrifugado por 5 minutos, 13.000 RPM, à 4°C, sendo desprezado o sobrenadante. Em seguida, os microtubos ficaram deitados sob a bancada, previamente limpa com álcool 70%, a fim de que o tecido que ficou no fundo do tubo, ficasse completamente seco. Esta etapa de lavagem é importante para sedimentar o DNA porventura solto e retirar todo xilol, pois este, inativa a proteinase K, que será utilizada na etapa seguinte para digestão das proteínas. A partir do material hidratado iniciou-se a e 30µl de proteinase K, em concentração de 10mg/ml; em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C “overnight”.

Após a incubação “overnight”, os tubos foram colocados em banho-maria a 95°C, por 10 minutos, para inativar a proteína K. Em seguida, foi acrescentado à amostra 250µl de clorofórmio com álcool isoamílico (24:1) e 250µl de fenol. Os tubos foram colocados no vortex e depois centrifugados a 10.000 RPM, por 5 minutos na temperatura ambiente. A fase aquosa, sobrenadante, foi transferida para novo eppendoff. Este procedimento foi realizado por duas vezes. Ao segundo sobrenadante, foi adicionado 40µl de acetato de sódio 3M, 1 ml de etanol gelado e colocado no freezer, por aproximadamente 2 horas; para precipitar o DNA.

A amostra foi centrifugada a 4°C, por 30 minutos, a 10.000 RPM. Em seguida, o sobrenadante foi retirado com cuidado, e o pellet, precipitado,

depois de seco à temperatura ambiente foi ressuspenso em 20µl de TE e mantido em geladeira, até a realização da PCR.

#### 4.3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica molecular usada para amplificar um segmento de DNA entre duas regiões de seqüência conhecida. Para isso, dois oligonucleotídeos, complementares, são usados como primers numa série de reações catalisadas pela DNA polimerase.

Foram utilizados dois genes com seqüência alvo da reação:

##### A - Seqüência-alvo: DNA ribossômico (rDNA)

Para a detecção do parasita, a seqüência alvo da PCR foi uma região do DNA ribossômico (rDNA), que codifica a subunidade menor do ribossomo (SSU). Esta região está presente em grande número de cópias nos organismos e inclui regiões conservadas que permitem identificar tanto o gênero *Leishmania* quanto os subgêneros do parasita (ULIANA et al., 1994).

Foram utilizados os oligonucleotídeos S4 (5' - GAT CCA GCT GCA GGT TCA CC -3') e S12 (5' - GGT TGA TTC CGT CAA CGG AC -3') descritos por ULIANA et al. (1994), que são complementares a duas regiões do rDNA que codifica a subunidade 18S, idênticas em todas as espécies de *Leishmania*. Estes oligonucleotídeos permitem a amplificação de um fragmento de 520 pb.

A PCR foi feita num volume final de 50µl, contendo 1 X tampão da enzima, 2mM cloreto de magnésio, 0,2 de mM desoxinucleotídeo trifosfato

---

 4. Material e Métodos
 

---

(dNTP), 0,2µM de cada oligonucleotídeo, 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Recombinant Brazilian<sup>®</sup>), 2µl de DNA da amostra.

Em cada reação de PCR, além das amostras era feito também um tubo controle negativo, que continha a mesma mistura da reação, menos o DNA, que era substituído por água bi-distilada autoclavada ou TE e um tubo controle positivo no qual era adicionado DNA extraído de promastigota de *L. (L.) amazonensis* (M2269).

A reação era realizada em equipamento termociclador automático (Techgene – Uniscience<sup>®</sup>) obedecendo-se os seguintes ciclos térmicos (Tabela 2):

Tabela 2: Ciclos térmicos da PCR.

TEMPERATURA	TEMPO	NÚMERO
94°C	4 minutos (desnaturação inicial)	1 ciclo
94°C	1 minuto (desnaturação)	35 ciclos
50°C	1 minuto (associação)	
72°C	1 minuto (extensão)	
72°C	7 minutos (extensão final)	1 ciclo

#### A1 – “Nested” – PCR

Foi feita uma segunda PCR, utilizando-se como DNA alvo 1µl da primeira reação S4 e S12, com um par de oligonucleotídeos. Foi feita uma segunda PCR, utilizando-se como DNA alvo 1µl da primeira reação S4 e S12, com um par de oligonucleotídeos: específicos para o gênero *Leishmania* S17 e S18, cuja seqüência é:

S17: 5'- CCAAG CTGCC CAGTA GAAT -3'

S18: 5'- TCGGG CGGAT AAAAC ACC- 3'

---



---

#### 4. Material e Métodos

---

(ZAMPIERI et al., 2005) uma vez que S4 e S12 amplificam seqüências que podem ser encontradas em outros tripanossomatídeos. Nessa PCR o fragmento amplificado é de cerca de 490pb.

Essa segunda reação foi executada em equipamento termociclador automático (Techgene – Uniscience<sup>®</sup>) obedecendo-se os seguintes ciclos térmicos (Tabela 3):

Tabela 3: Ciclos térmicos da PCR.

TEMPERATURA	TEMPO	NÚMERO
94°C	4 minutos (desnaturação inicial)	1 ciclo
94°C	1 minuto (desnaturação)	30 ciclos
55°C	1 minuto (associação)	
72°C	30 segundos (extensão)	
72°C	7 minutos (extensão final)	1 ciclo

#### B - Seqüência-alvo: gene G6PD

Para detectar o parasita, foram utilizadas, como seqüência alvo, regiões conservadas do gene G6PD, presente em cópia única no genoma de *Leishmania* e que codifica a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (CASTILHO et al., 2003). Foram utilizados os oligonucleotídeos ISVC (5'- ATC ACA ATG ATG GTC AAC GCA C – 3') e ISVB (5'- TAC TCG CCA TGT CGG AGG – 3') descritos por Castilho (2003) para identificar DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis* de espécies não *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Estes oligonucleotídeos permitem a amplificação de um fragmento de 333 pb.

A PCR foi feita num volume final de 50µl, contendo 1 X tampão da enzima, 2mM cloreto de magnésio, 0,2 de mM desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 0,2µM de cada oligonucleotídeo, 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Recombinant Brazilian<sup>®</sup>), 2µl de DNA da amostra.

Em cada reação de PCR, além das amostras, era feito também um tubo controle negativo, que continha a mesma mistura da reação, menos o DNA, que era substituído por água bi-destilada autoclavada ou TE e dois tubos controle positivo: no primeiro era adicionado DNA extraído de promastigota de *L. (L.) amazonensis* (M2269) e no segundo DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

A reação era realizada em equipamento termociclador automático (Techgene – Uniscience<sup>®</sup>) obedecendo-se os seguintes ciclos térmicos (Tabela4):

Tabela 4: Ciclos térmicos da PCR.

TEMPERATURA	TEMPO	NÚMERO
94°C	4 minutos (desnaturação inicial)	1 ciclo
94°C	1 minuto (desnaturação)	30 ciclos
65°C	1 minuto (associação)	
72°C	1 minuto (extensão)	
72°C	10 minutos (extensão final)	1 ciclo

#### 4.3.4.3 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese através de gel de agarose é um método padrão usado para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA.

A concentração de agarose determina a densidade do gel, que influi na capacidade de migração das moléculas de DNA. A mobilidade eletroforética do DNA também é afetada pela composição e força iônica do tampão utilizado, pela voltagem e pela temperatura.

Os produtos amplificados das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, com voltagens de 100V.

O gel era preparado com 2 gramas de agarose (Sigma<sup>®</sup>) em 100ml de TAE, aquecido em microondas até dissolução da agarose. Em seguida era adicionado no gel ainda quente, 3µl de brometo de etídio, que funciona como corante fluorescente e sob radiação ultravioleta permite a visualização do DNA. A solução era, então, despejada na cuba, onde era colocado o 'pente' para marcação dos poços. O tampão de eletroforese era o TAE 1 X (40mM de Tris-acetato, 2mM EDTA pH 8,0).

Adicionou-se 9µl de cada produto das PCRs a 1µl do tampão de carga, constituído de 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol, 15% de ficoll tipo 400 (Pharmacia Biotech<sup>®</sup>, USA) para a visualização da corrida. Essa mistura era aplicada nos poços do gel. Cada corrida de eletroforese continha, além dos produtos da PCR, controle positivo e negativo e um padrão de peso molecular que era DNA do fago Lambda clivado com a enzima de restrição Hind III ou 1Kb DNA ladder (Gibco-BRL<sup>®</sup>). As bandas foram observadas sob luz ultravioleta e registradas em câmara fotográfica Kodak<sup>®</sup> ds ou Eagleeye II – Stratagene<sup>®</sup>.

#### **4.3.4.4 Purificação de produtos da PCR**

O sucesso do seqüenciamento depende da qualidade e concentração do DNA molde. Os fragmentos de DNA ou produtos da PCR a serem seqüenciados devem ser específicos e estar livres de primers, dNTPs, enzimas e tampão, ou seja, o DNA molde deve ser purificado.

Todos os produtos da PCR com S17 e S18 foram purificados pelo protocolo descrito por GLENN e SCHABLE (2005), como resumido a seguir.

Transferiu-se 20µl do produto da PCR S17 e S18 para microtubos tipo “eppendorfs” e foi acrescentado 20µl de PEG e homogeneizado. Em seguida, o microtubo foi colocado na estufa a 37°C por 15 minutos. Logo após esse procedimento, os eppendorfs foram centrifugados a 4°C por 15 minutos a 13.000 RPM. O sobrenadante foi descartado com cuidado para não ocorrer o deslocamento do pellet e em seguida adicionado 80µl de ETOH 80% gelado e centrifugado a 4°C por 2 minutos a 13.000 RPM. Esse procedimento (etanol 80% e centrifugado por 2 minutos) foi realizado duas vezes e depois que os eppendorfs foram secos à temperatura ambiente, o mesmo foi ressuspendido em 10µl de TLE.

O fragmento de DNA purificado era quantificado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, comparando-se o tamanho da banda da amostra com a do padrão 1Kb DNA (Biolabs®), e mantido em geladeira, até a realização da reação de seqüenciamento.

#### **4.3.4.5 Seqüenciamento de DNA**

Esta reação é similar a uma PCR, onde uma pequena amostra de DNA é amplificada milhares de vezes *in vitro*, porém de forma diferente da PCR.



---

 4. Material e Métodos
 

---

Apenas um primer é utilizado para síntese das fitas. A reação foi realizada empregando-se “DNA Sequencing Kit – Big Dye™ Terminator v 3.0 Cycle Sequencing – Applied Biosystems” (ABI Prism) (Tabela 5).

Tabela 5: Reação de seqüência.

Big dye 30	2,0µl
Save Money	6,0µl
Primer S18 (Mol/ul)	1,0µl
H <sub>2</sub> O Milli-Q	qsp 20µl
DNA	conforme análise na eletroforese
Total da reação = 20µl	

Em seguida a reação foi levada ao termociclador obedecendo aos seguintes ciclos (Tabela 6):

Tabela 6: Reação de seqüenciamento.

Temperatura	Tempo
a. 96°C	1' 30"
b. 96°C	20"
c. 55°C	20"
d. 60°C	4'
e. 4°C	∞
50ciclos de b a d	

As seqüências de nucleotídeos foram determinadas automaticamente em aparelho 3700 DNA Analyser (ABI Prism), analisadas e alinhadas por meio do programa de computador BioEdit (Hall 1999), e comparadas com as seqüências de nucleotídeos de *Leishmania (L.) amazonensis*,

*L.(V.)braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(L.) chagasi* e *L.(L.)donovani*, disponíveis no GeneBank.

#### **4.3.4.6 Análise dos resultados**

Os dados foram analisados através dos softwares Planilha Eletrônica Excel e MiniTab 13. Para descrever os achados com relação aos casos ocorridos foram utilizadas tabelas de frequência e frequência relativa, tabelas de contingência, e gráficos de barra. O histograma foi utilizado para avaliar a distribuição dos dados relacionados à idade.

Também para descrever a idade dos pacientes desta pesquisa foram utilizadas medidas descritivas de centralidade como a média e mediana, medidas de posição como valor mínimo, valor máximo, o primeiro e o terceiro quartil (Q1 e Q3) e medidas de dispersão que avaliam a dispersão dos dados com relação à média como desvio padrão e o coeficiente de variação (CV).

Para testar hipóteses sobre a relação entre duas variáveis qualitativas, por exemplo, entre sexo e o tipo de lesão, foi utilizado o teste do Qui-Quadrado para independência e o teste Qui-Quadrado para aderência para testar a evolução das notificações ao longo do período. Para todos os testes, utilizou-se um nível de significância  $\alpha=5\%$  (VIEIRA, 1981).

Quando os valores esperados foram menores que 5, foi utilizado o teste exato de Fisher, pois este teste utiliza a distribuição binomial exata, e não uma aproximação.

#### 4. *Material e Métodos*

---



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Cutânea no Pontal do Paranapanema.

Entre março de 1995 e dezembro de 2004 foram notificados 148 casos de leishmaniose cutânea na região do Pontal. Destes, 78 casos tinham biópsia, sendo 72 fragmentos de pele e 6 fragmentos de mucosa.

A variação de incidência de LCA dos casos que tinham biópsia no período de 1995 a 2004 está na Figura 4.

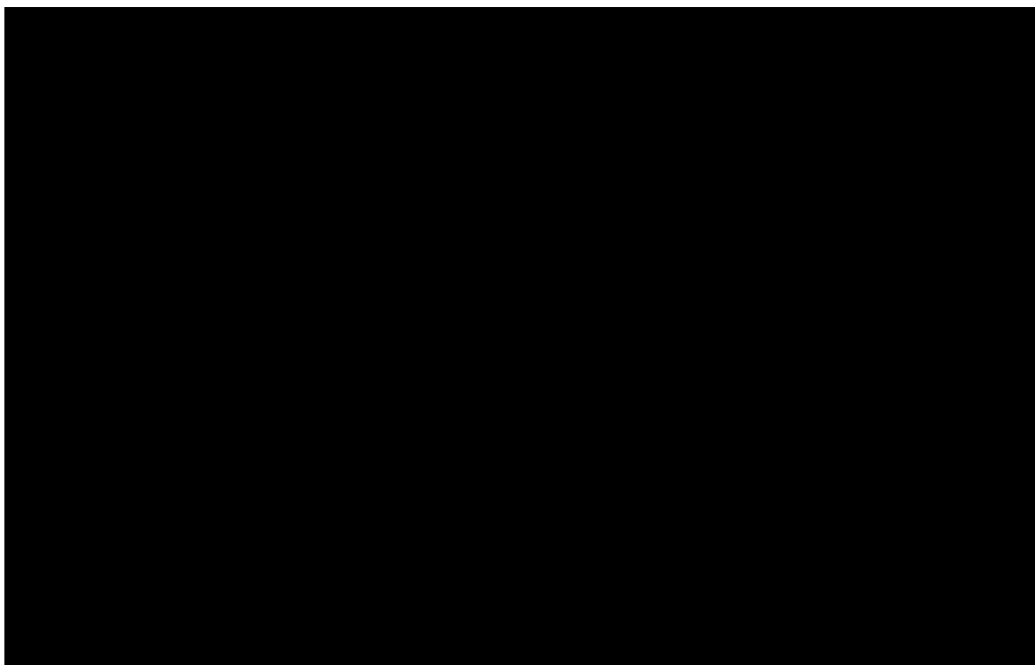


Figura 4: Variação de incidência dos casos de LCA ocorridos no Pontal do Paranapanema entre março de 1995 e dezembro de 2004

## 5. Resultados

A distribuição desses casos segundo o sexo mostrou que 53 (67,9%) foram no sexo masculino e 25 (32,1%) no feminino (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição dos casos de LCA segundo sexo. Pontal do Paranapanema - SP.

<b>SEXO</b>	<b>Qt. cit.</b>	<b>Freq.</b>
<b>MASCULINO</b>	53	67.9%
<b>FEMININO</b>	25	32.1%
<b>TOTAL</b>	<b>78</b>	<b>100%</b>

A doença atingiu todas as faixas etárias, com baixa frequência nos menores de 20 anos (Tabela 8); porém, tendendo a aumentar progressivamente até a faixa de 40 a 50 anos; sendo que a partir dos 50 anos há uma diminuição progressiva. Como p-value < 0,05, as diferenças nas faixas etárias pesquisadas são significativas, mostrando maior concentração na faixa de 40 a 49 anos. Este padrão mostrou concentração de 51,3% dos casos na faixa de 30 a 49 anos, (Figura 5).

Tabela 8: Distribuição da LCA segundo a faixa etária. Pontal do Paranapanema – SP.

<b>IDADE</b>	<b>Qt. cit.</b>	<b>Freq.</b>
<b>10 A 19</b>	5	6.4%
<b>20 A 29</b>	15	19.2%
<b>30 A 39</b>	18	23.1%
<b>40 A 49</b>	22	28.2%
<b>50 A 59</b>	11	14.1%
<b>60 A 69</b>	5	6.4%
<b>70 A 79</b>	2	2.6%
<b>TOTAL</b>	<b>78</b>	<b>100%</b>

$$\chi^2_{cal} = 30.4103, \text{ gl} = 6, \text{ p-value} = 3.284.10^{-05}$$

## 5. Resultados

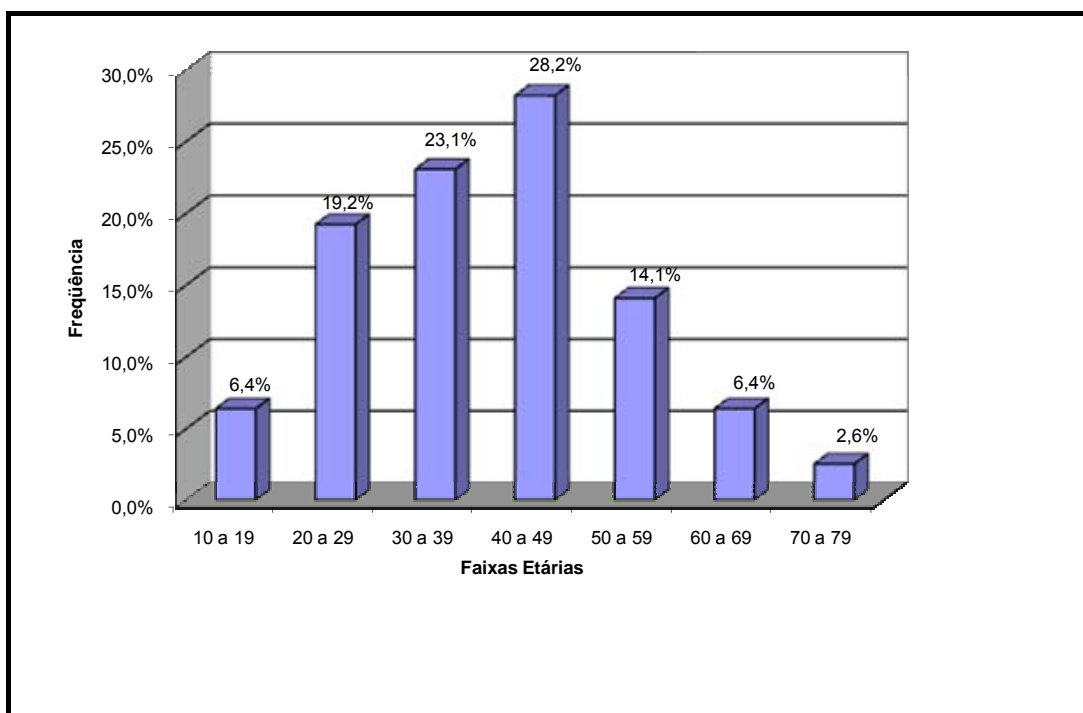


Figura 5: Distribuição dos casos de LCA segundo a faixa etária. Pontal do Paranapanema – SP.

Na tabela 9 encontram-se os dados referentes às medidas descritivas obtidas como: média, mediana, desvio padrão, coeficiente de variação (CV), valor mínimo, valor máximo, primeiro quartil (Q1) e terceiro quartil (Q3). A média dos casos notificados foi de 40 anos com desvio padrão de 14,33, o que indica uma alta variação ( $CV > 30\%$ ). A mediana foi de 41 anos, o primeiro quartil foi de 29,25 anos, ou seja, 25% dos casos tinham idade inferior a 29,25 anos e o terceiro quartil foi de 49 anos. Portanto, 75% dos casos tinham idade inferior a 49 anos.

## 5. Resultados

Tabela 9: Medidas descritivas básicas da variável idade nas notificações de LCA no Pontal do Paranapanema – SP.

Média	40
Mediana	41
Desvio padrão	14.33006
Coefficiente de Variação	35.83%
Coefficiente de Assimetria	0.148222
Mínimo	9
Máximo	72
QUARTIL1	29.25
QUARTIL 3	49

## 5.2 Aspectos Clínicos e histopatológicos dos casos de Leishmaniose Cutânea Americana no Pontal do Paranapanema

Os dados referentes a aspectos clínicos e histopatológicos são relativos a 66 casos e não 78, pois 12 casos não tinham informações clínicas.

A forma clínica predominante foi a cutânea, encontrada em 92.3% dos casos e a cutânea- mucosa encontrada em 7,7% (Tabela 10 e Figura 6).

Tabela 10 – Formas clínicas dos casos notificados no Pontal do Paranapanema – SP.

F CLÍNICA	Qt. cit.	Freq.
CUTÂNEA	72	92.3%
CUTÂNEA MUCOSA	6	7,7%
TOTAL OBS.	66	100%



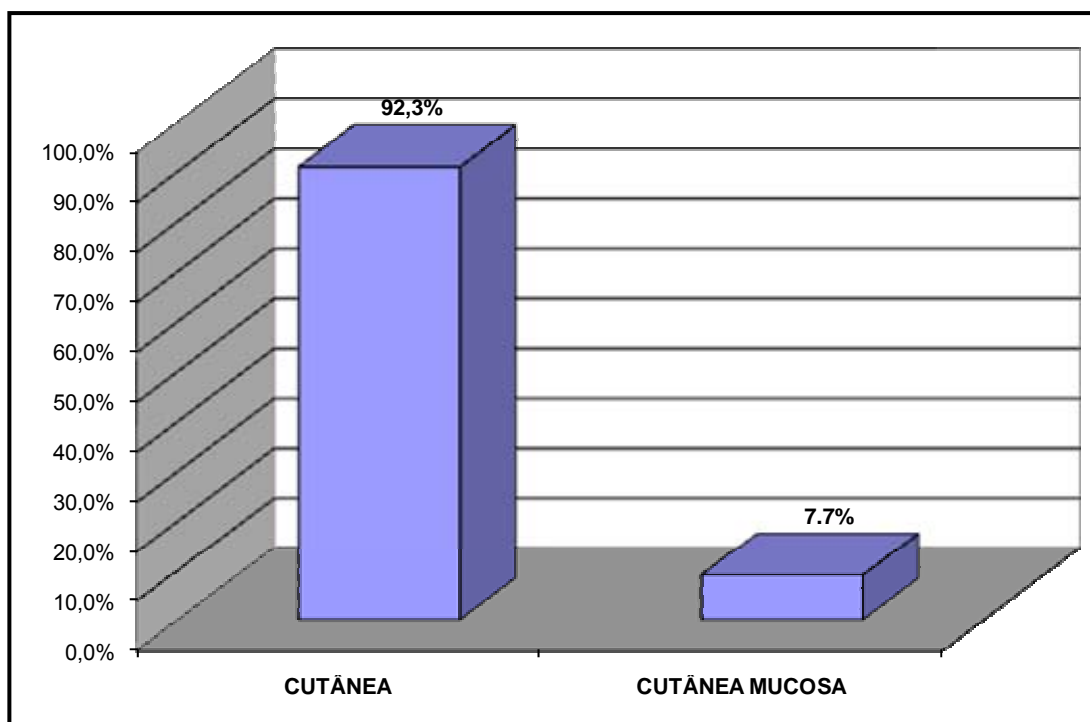


Figura 6: Formas clínicas dos casos notificados no Pontal do Paranapanema.

Considerando-se somente a forma cutânea e cutânea-mucosa, pelo teste binomial temos que  $p\text{-value} = 2.726e-12$ , como  $p\text{-value} < 0,05$ , a diferença entre as proporções é significativa e pode-se afirmar que a prevalência da infecção cutânea é maior que a cutânea mucosa.

A associação do tipo de lesão com o sexo é demonstrada na Tabela 11. Neste caso, não foi constatado, através do teste qui-quadrado, associação significativa entre o tipo de comprometimento e o sexo do indivíduo.

Como o valor esperado de algumas células foi menor que 5, foi usado o teste exato de Fisher, assim encontramos o valor  $p\text{-value} = 0.06347$ , maior que 0,05, portanto não podemos afirmar que existe associação entre sexo e forma clínica. A razão de chances estimada neste caso foi de  $RC = 5.4377$ , com intervalo de confiança de 95% dado por  $IC\ 95\% (0.6893941;$

## 5. Resultados

64.4004700). Ou seja, se o resultado fosse significativo, em média poderíamos afirmar que a chance de um indivíduo do sexo masculino ter forma clínica cutânea em relação à cutânea-mucosa é 5.4377 vezes a de um indivíduo do sexo feminino, no entanto como o resultado não foi significativo no nível de 5%, este resultado não pode ser afirmado.

Tabela 11: Associação entre formas clínicas e sexo dos indivíduos do Pontal do Paranapanema – SP.

Sexo/F Clínica	Cutânea		Cutânea Mucosa		Total	
	Freq.	Perc.	Freq.	Perc.	Freq.	Perc.
<b>Masculino</b>	44	66,7%	2	3,0%	46	69,7%
<b>Feminino</b>	16	24,2%	4	6,1%	20	30,3%
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>90,9%</b>	<b>6</b>	<b>9,1%</b>	<b>66</b>	<b>100,0%</b>

Qui<sup>2</sup>=4,23, gl=2, 1-p=87,94%

Quase todos os casos diagnosticados foram de lesão única (92,5%) e 7,6% eram lesões múltiplas (2 ou mais), Tabela 12.

Tabela 12: Associação entre número de lesão e sexo dos indivíduos do Pontal do Paranapanema – SP.

Sexo/N Lesões	Uma		Duas ou Mais		Total	
	Freq.	Percent.	Freq.	Percent.	Freq.	Percent
<b>Masculino</b>	43	65,2%	4	6,1%	47	71,2%
<b>Feminino</b>	18	27,3%	1	1,5%	19	28,8%
<b>Total</b>	<b>61</b>	<b>92,5%</b>	<b>5</b>	<b>7,6%</b>	<b>66</b>	<b>100,0%</b>

Qui<sup>2</sup>=4,23, gl=2, 1-p=87,94%

## 5. Resultados

Dos cinco casos com duas ou mais lesões, 2 foram de *L.(L.) amazonensis* e 3 não tiveram as espécies identificadas.

Foi utilizado o teste exato de Fisher, para avaliar a associação entre sexo e número de lesão e neste caso o p-value = 1, ou seja, não existe associação entre sexo e número de lesões. A razão de chances foi de RC = 1.064346. Podemos observar que proporcionalmente para a classe sexo, o número de lesão é igual, ver Tabela 13 e Figura 7.

Tabela 13: Associação entre sexo e o número de lesões.

Sexo/N Lesões	Uma	Duas ou Mais	Total
<b>Masculino</b>	91,5%	8,5%	100,0%
<b>Feminino</b>	94,7%	5,3%	100,0%
<b>Total</b>	<b>92,4%</b>	<b>7,6%</b>	<b>100,0%</b>

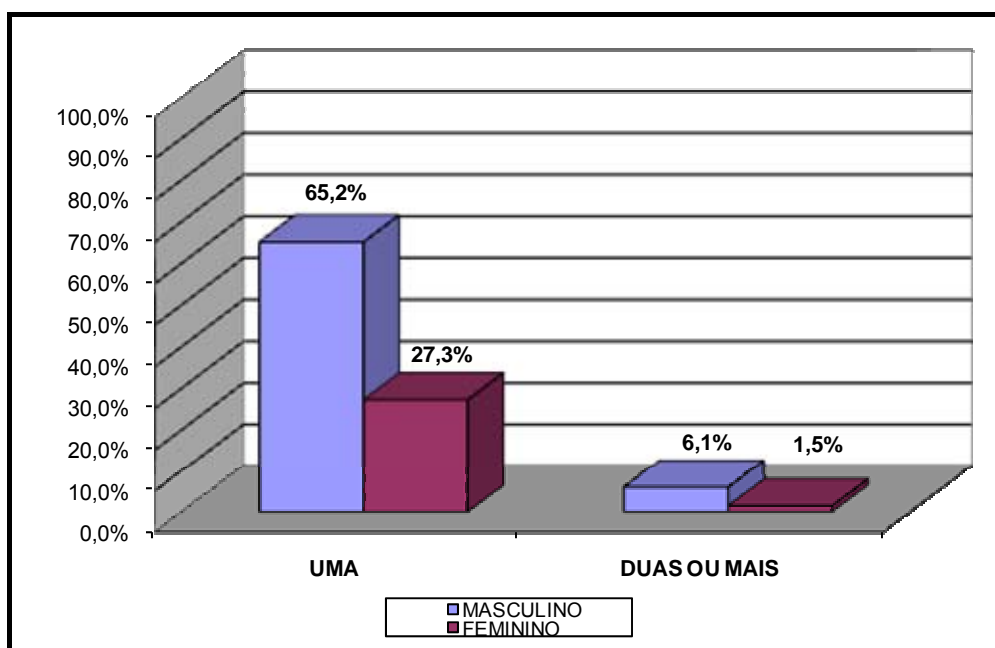


Figura 7: Associação entre número de lesões e sexo dos indivíduos, notificados no Pontal do Paranapanema, SP.

As lesões cutâneas eram circulares ou elípticas, variando de 2 a 4 cm, na maioria única.

Os pacientes, na sua maioria, adquiriram a infecção trabalhando em áreas de desmatamento; eram funcionários do PEMD; trabalhadores rurais assentados ou acampados na região, familiares, professoras e agentes de saúde.

As lesões ulceradas tinham graus variáveis de espessamento epidérmico nas bordas, constituindo a hiperplasia pseudoepiteliomatosa.

O exame das 78 biópsias foi realizado em 72 fragmentos de pele e 6 de mucosa. Todos os tecidos foram fixados em formalina, incluídos em parafina e corados pela hematoxilina e eosina (HE) para o diagnóstico histopatológico.

A análise histopatológica mostrou hiperplasia epitelial e reação inflamatória granulomatosa com infiltrado mononuclear com plasmócitos, que permitiu o reconhecimento de 04 padrões histopatológicos:

1. reação inflamatória com infiltrado mononuclear com plasmócitos

Figura 8

2. reação granulomatosa (RG) - Figura 9

3. reação granulomatosa com células gigantes (RGCG) Figura 10

4. reação granulomatosa com necrose (RGN) Figura 11

5. reação granulomatosa com necrose e células gigantes (RGNCG)

Figura 12

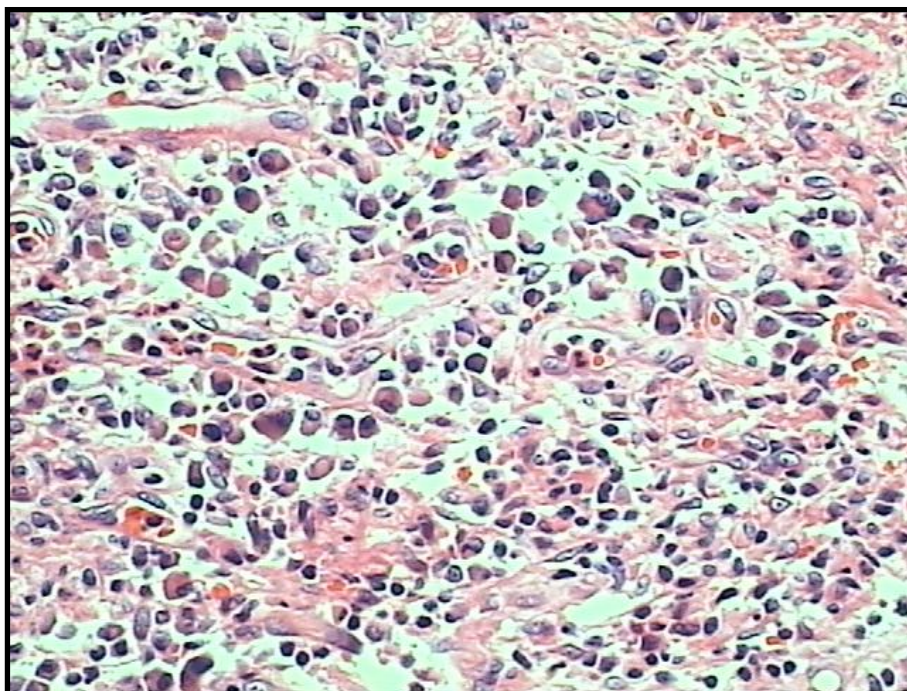


Figura 8: Infiltrado inflamatório mononuclear na pele rico em plasmócitos. HE. AO: x400.

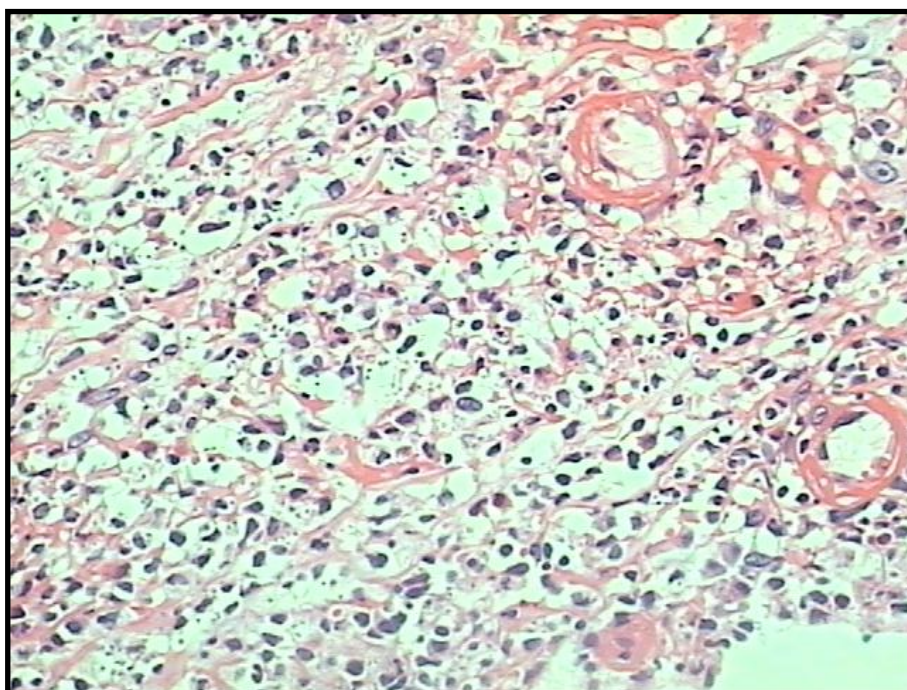


Figura 9: Reação granulomatosa na pele. HE. AO: x 400.

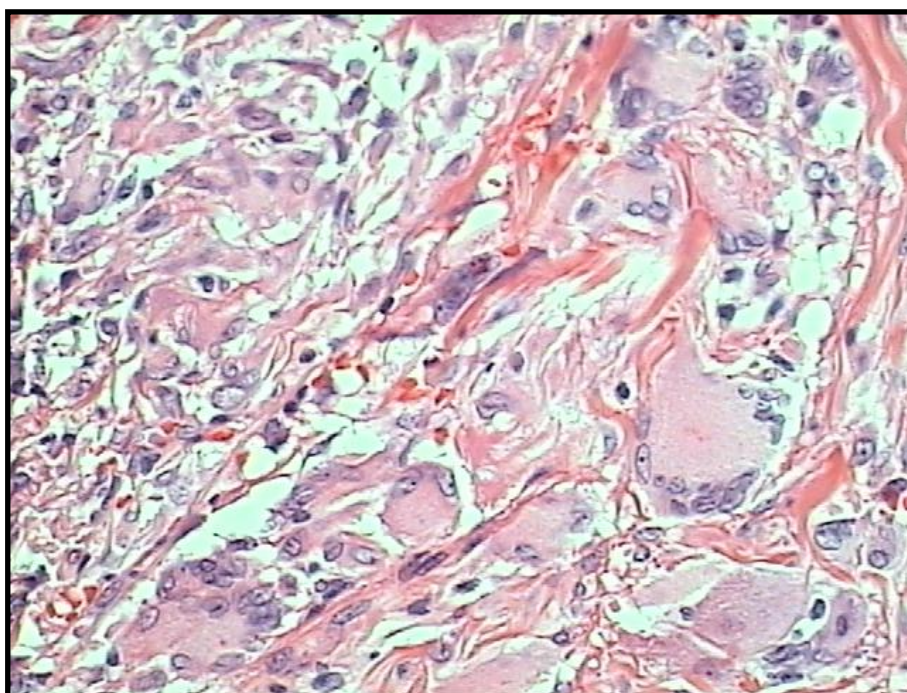


Figura 10: Reação granulomatosa na pele com células gigantes. HE. AO: x400.

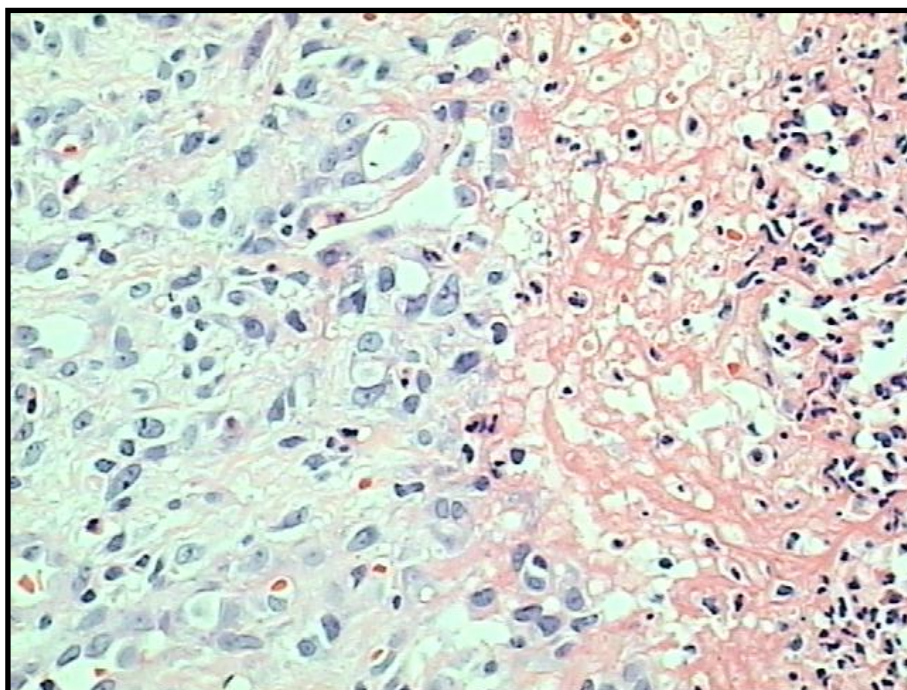


Figura 11: Reação granulomatosa na pele com necrose. HE. AO: x400.

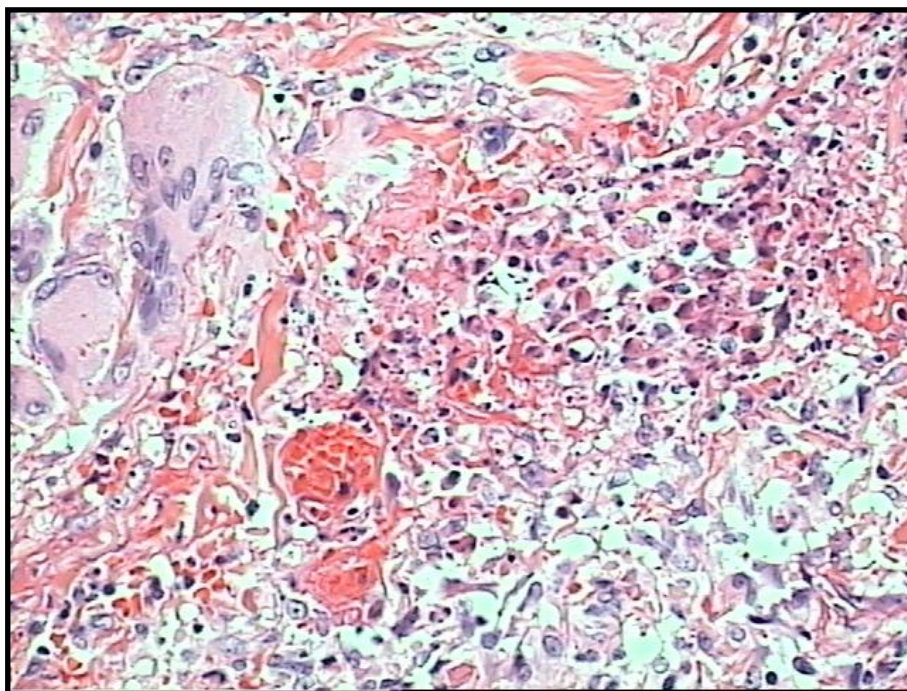


Figura 12: Reação granulomatosa com necrose e células gigantes. HE. AO: x 400.

Em relação às lesões granulomatosas, a reação granulomatosa (RG) e a reação granulomatosa com células gigantes (RGCG) foram encontradas em 71,8% (56/78) e 12,8% (10/78) das biópsias respectivamente. A reação granulomatosa com necrose (RGN) foi observada em 10,3% (8/78) dos casos e granuloma com necrose e células gigantes (RGNCG) apareceram em menor proporção, 5,1% (4/78), conforme mostra a Tabela 14 e Figura 13. Pelo teste Qui-quadrado, temos  $\chi^2_{cal} = 92,0513$ , gl =3, p-value = 2.2e-16 ou seja , como p-value < 0.05, podemos afirmar que existe diferença entre as categorias de reação.

## 5. Resultados

Tabela 14: Porcentagem de Casos por Padrão Histopatológico Granulomatoso.

Reação	Freq.	Percent.
G	56	71,8%
GCG	10	12,8%
GN	8	10,3%
GNCG	4	5,1%
Total	78	100%

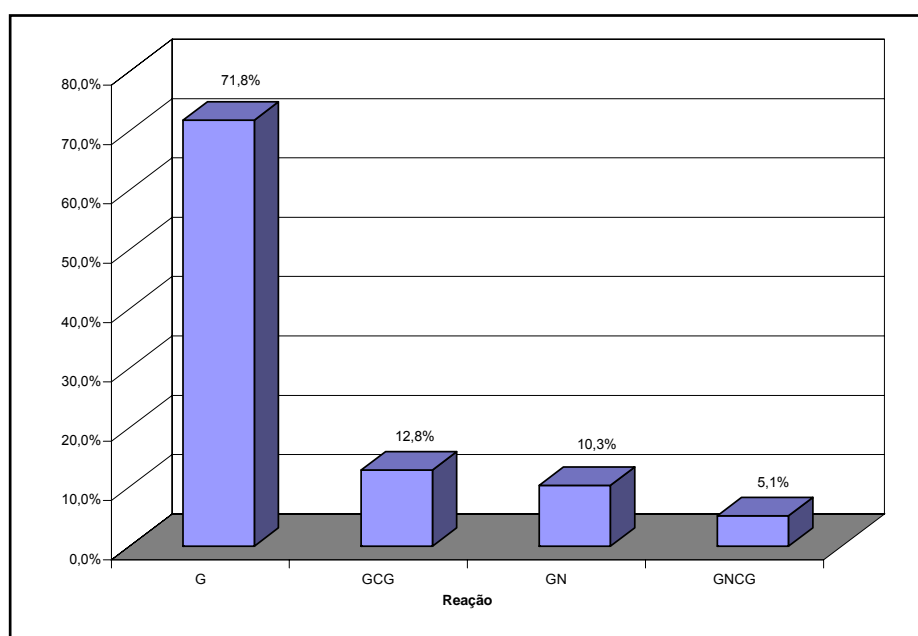


Figura 13: Porcentagem de Casos por Padrão Histopatológico Granulomatoso.

### 5.3 Diagnóstico Parasitológico da Leishmaniose Cutânea no Pontal do Paranapanema.

#### 5.3.1 Exames parasitológicos: pesquisa direta do parasita nas lesões

A pesquisa direta das formas amastigotas do parasita foi realizada por exame histopatológico, em material obtido por biópsia da borda de lesão, corados pela hematoxilina-eosina (HE) e por imunohistoquímica, utilizando-



se anticorpos policlonais, produzidos no Laboratório de Patologia das Moléstias Infecciosas, LIM-50, marcados com imunoperoxidase (IH).

### 5.3.1.1 Identificação do Parasita pela Histopatologia, HE

Dos 78 pacientes que realizaram biópsias para exame histopatológico foi detectada a *Leishmania* em 40 amostras (51.3%), Tabela 15. A diferença com a repartição de referência não é significativa.

Tabela 15: Coloração pela HE.

HE	Qt. cit.	Freq.
<b>POSITIVO</b>	40	51,3%
<b>NEGATIVO</b>	38	48,7%
<b>TOTAL OBS.</b>	<b>78</b>	<b>100%</b>

Quando avaliamos a relação entre sexo e HE, pelo teste qui-quadrado temos que,  $\chi^2_{cat} = 0.7809$ , gl = 1, p-value = 0.3769, ou seja, como p-value > 0.05, podemos afirmar que não existe associação entre diagnóstico HE e sexo. A razão de chances estimada é de RC = 1,5293, ou seja, se o resultado fosse significativo, poderíamos afirmar que a chance do indivíduo do sexo masculino apresentar HE positivo em relação ao HE negativo é de 1.5293 vezes a de um indivíduo do sexo feminino. (Tabela 16 e Figura 14).

## 5. Resultados

Tabela 16: Pesquisa do parasita segundo o sexo. Técnica HE.

SEXO/HE	POSITIVO		NEGATIVO		TOTAL	
	Freq.	Percent.	Freq.	Percent.	Freq.	Percent.
<b>MASCULINO</b>	29	37,2%	24	30,8%	<b>53</b>	<b>67,9%</b>
<b>FEMININO</b>	11	14,1%	14	17,9%	<b>25</b>	<b>32,1%</b>
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>	<b>51,3%</b>	<b>38</b>	<b>48,7%</b>	<b>78</b>	<b>100%</b>

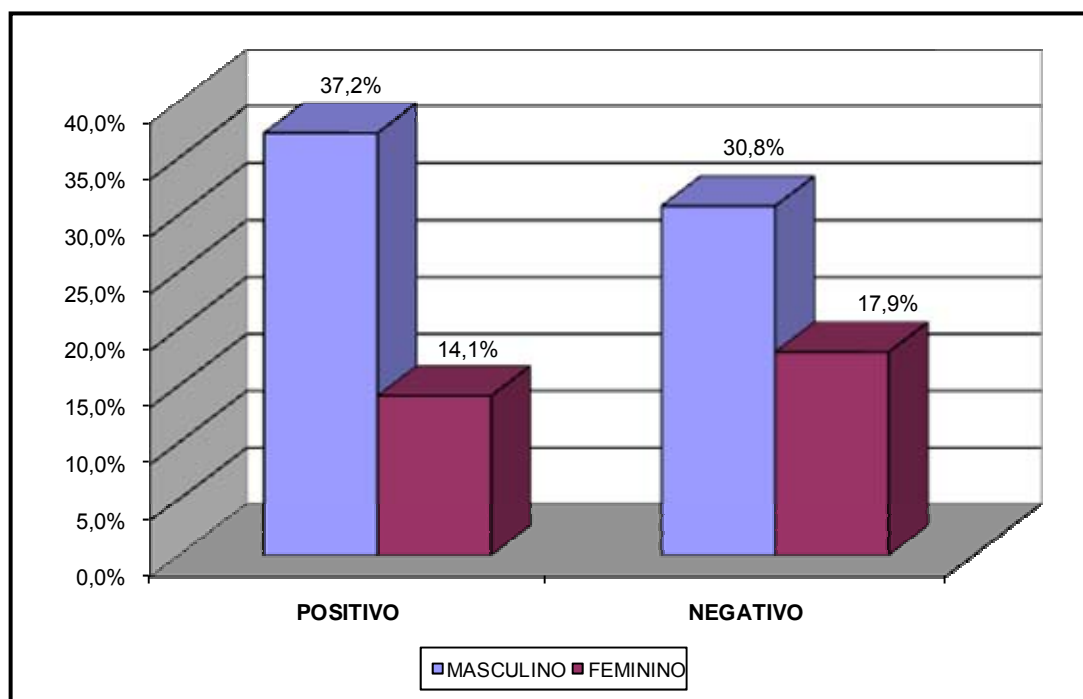


Figura 14: Pesquisa do parasita segundo o sexo. Técnica HE.

Analisando-se as biópsias coradas pela técnica HE, 24,4% apresentaram raros, 19,2% moderados e 7,7% numerosos parasitas. Isto totalizou 51,3% de casos com diagnóstico conclusivo para leishmaniose cutânea (Figura 15).

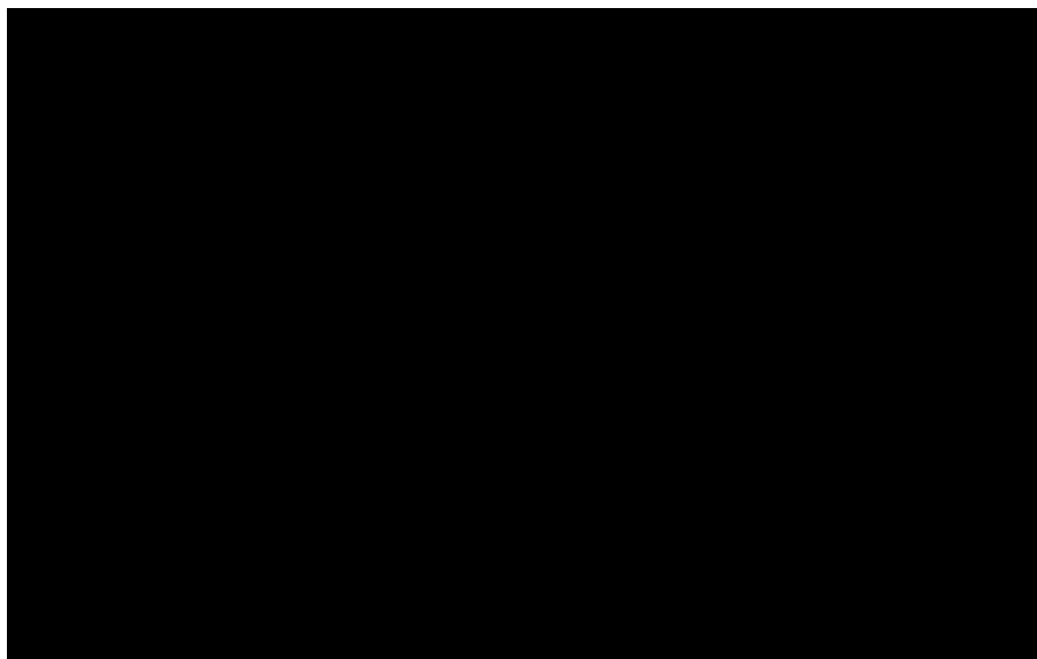


Figura 15: Pesquisa do parasita na pele em bópsias, HE. Pontal do Paranapanema, São Paulo.

Pelo teste qui-quadrado para aderência, temos que,  $\chi^2_{cal} = 27,9487$ ,  $gl = 3$ ,  $p\text{-value} = 3.723 \text{ e-}06$ , ou seja, como  $p\text{-value} < 0.05$ , podemos afirmar que existe diferença entre os índices de parasitismo.

A reação granulomatosa, apresentou o maior índice de casos negativos (26) e de casos com numerosos parasitas (6) (Tabela 17 e figura 16).

Tabela 17: Análise do padrão histopatológico com relação ao índice de parasitismo em biópsias. Pontal do Paranapanema, SP.

Índice de Parasitismo	G	GCG	GN	GNCG	Total
<b>Negativo</b>	26	4	6	2	<b>38</b>
<b>Raros Parasitas</b>	15	4	0	0	<b>19</b>
<b>Moderados Parasitas</b>	9	2	2	2	<b>15</b>
<b>Numerosos Parasitas</b>	6	0	0	0	<b>6</b>
<b>Total</b>	<b>56</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>78</b>

**G:** granuloma; **GCG:** granuloma com células gigantes; **GN:** granuloma com necrose; **GNCG:** granuloma com necrose e células gigantes.

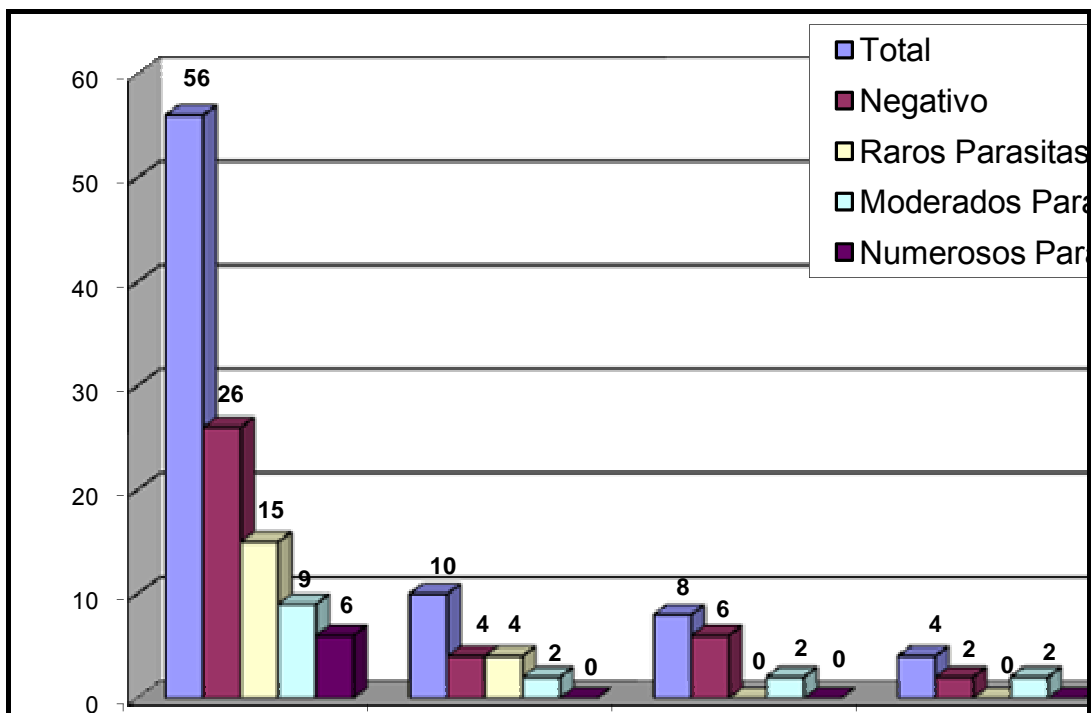


Figura 16: Análise do padrão histopatológico com relação ao índice de parasitismo em biópsias. Pontal do Paranapanema, SP.

### 5.3.1.2- Identificação do Parasita Através da Reação de Imunohistoquímica (IH)

Exames que utilizam a técnica de imunoperoxidase possibilitam a detecção mais eficiente das formas amastigotas do parasita nos tecidos infectados.

Para isto, cortes histológicas adicionais foram utilizados para a realização das reações imunohistoquímicas utilizando-se anticorpos marcados com imunoperoxidase para detecção do parasita.

Setenta e oito biópsias, 72 fragmentos de pele, 6 de mucosa foram submetidas à técnica Imunoenzimática da Avidina-Biotina (LSAB-DAKO®)

O anticorpo primário utilizado foi soro de camundongos anti-*L.(L)amazonensis*, produzido no Laboratório de Patologia das Moléstias

Infecciosas, LIM-50. A reação foi revelada pelo cromógeno diaminobenzidina, que produz a coloração castanho-escura ao parasita, em lâmina corada com hematoxilina. As formas amastigotas do parasita apresentaram parede celular corada em castanho-escuro e muitas vezes o cinetoplasto apareceu intensamente corado. Os parasitas, assim marcados, foram vistos no citoplasma de macrófagos, em pequenos agrupamentos ou em alguns casos como escassas formas isoladas no meio extra-celular (Figura 17). Os casos que apresentaram parasitismo alto tinham predomínio de macrófagos vacuolizados sugerindo o envolvimento de outra espécie como agente etiológico da LCA na região (Figura 18).

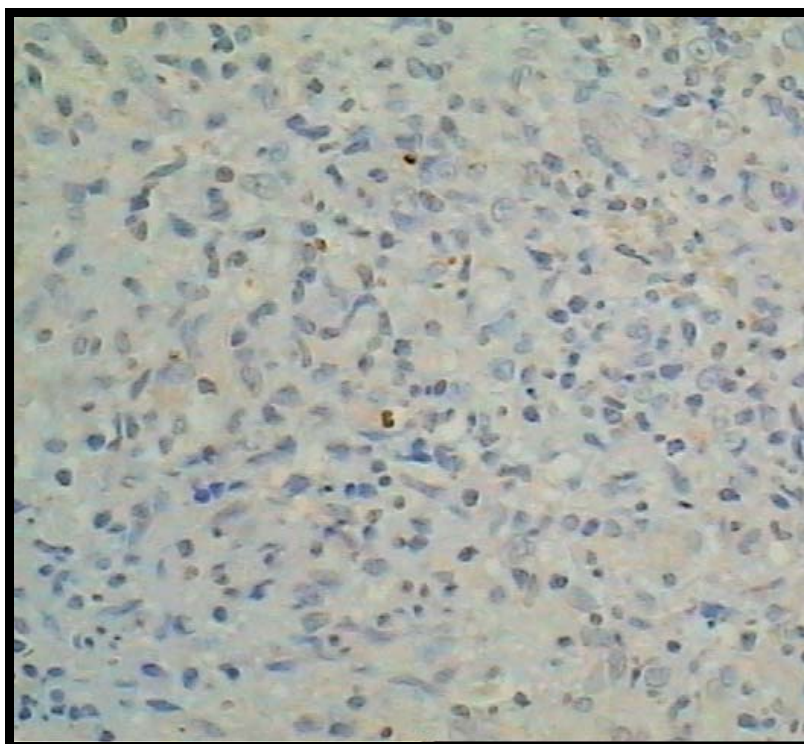


Figura 17: Reação de imunohistoquímica. Anticorpo policlonal. Baixo parasitismo. AO: x400

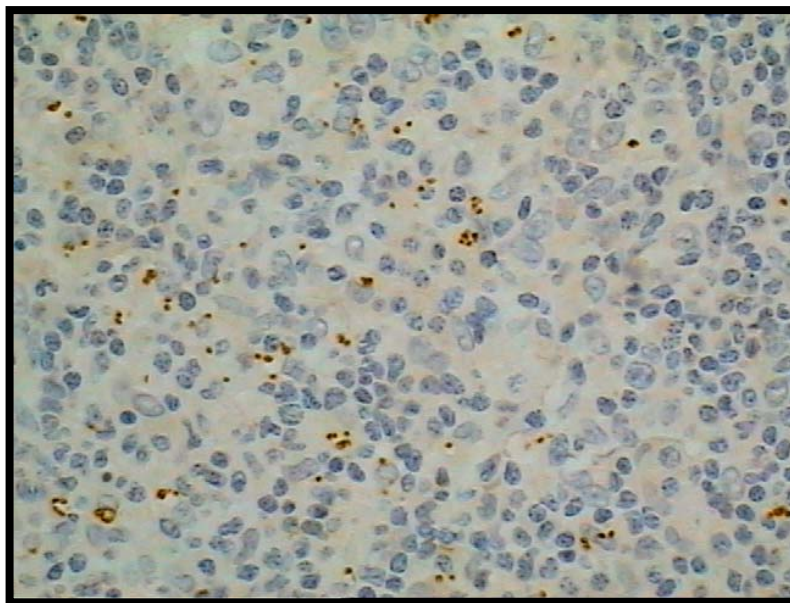


Figura 18: Reação de imunohistoquímica. Anticorpo policlonal. Alto parasitismo. AO: x400.

A Tabela 18 mostra os resultados da pesquisa do parasita e seus antígenos pela técnica de imunohistoquímica nas biópsias.

Tabela 18: Resultados da reação de imunohistoquímica.

IH	Qt. cit.	Freq.
<b>POSITIVO</b>	52	66,7%
<b>NEGATIVO</b>	26	33,3%
<b>TOTAL OBS.</b>	<b>78</b>	<b>100%</b>

Quando avaliamos a relação entre sexo e IH, pelo teste qui-quadrado temos que,  $\chi^2_{cal} = 0.7358$ ,  $gl = 1$ ,  $p\text{-value} = 0.391$ , ou seja, como  $p\text{-value} > 0.05$ , podemos afirmar que não existe associação entre diagnóstico IH e sexo (Tabela 19 e Figura 19). A razão de chances estimada é de  $RC = 1.5329$ , ou seja, se o resultado fosse significativo, poderíamos afirmar que a

## 5. Resultados

chance do indivíduo do sexo masculino apresentar IH+ em relação ao IH- seria de 1.5329 vezes maior que a do indivíduo do sexo feminino.

Tabela 19: Associação entre Imunohistoquímica e sexo dos pacientes.

SEXO/IH	POSITIVO		NEGATIVO		TOTAL	
	Freq.	Percent.	Freq.	Percent.	Freq.	Percent.
<b>MASCULINO</b>	37	47,4%	16	20,5%	<b>53</b>	<b>67,9%</b>
<b>FEMININO</b>	15	19,2%	10	12,8%	<b>25</b>	<b>32,1%</b>
<b>TOTAL</b>	<b>52</b>	<b>66,7%</b>	<b>26</b>	<b>33,3%</b>	<b>78</b>	<b>100%</b>

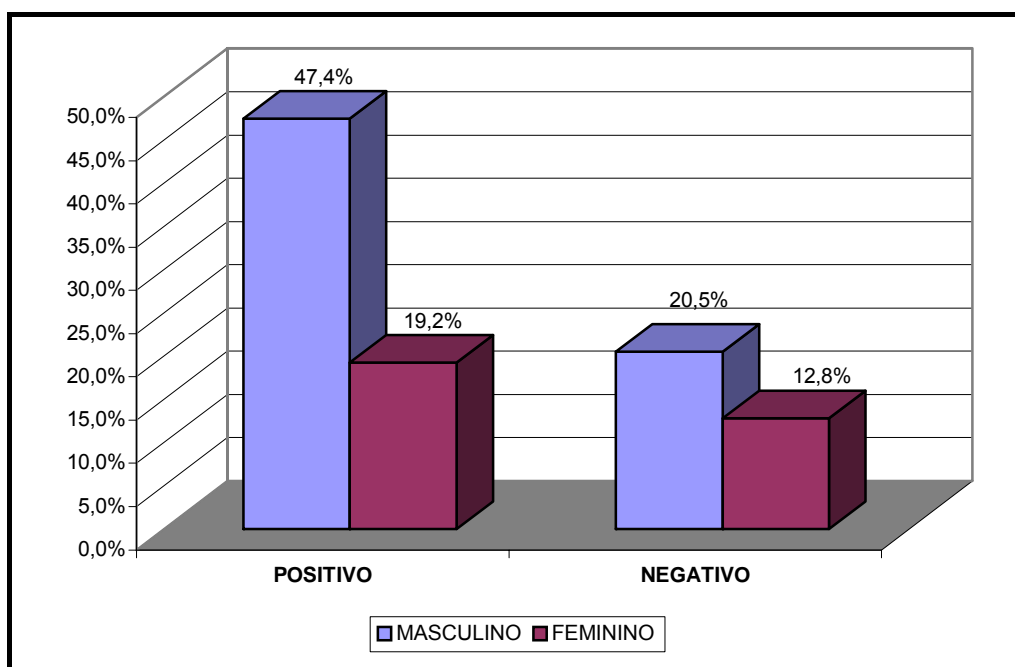


Figura 19: Associação entre imunohistoquímica e sexo dos pacientes.

Ao avaliarmos as reações de IH e HE, verificamos que o índice de concordância de positividade foi de 38,5% e de negatividade foi de 20,5%.

Pelo teste qui-quadrado, temos que  $\chi^2_{cal} = 2.5658$ ,  $gl = 1$ ,  $p\text{-value} = 0.1092$ ,

## 5. Resultados

ou seja, como  $p\text{-value} > 0.05$ , não existe associação entre os diagnósticos HE e IH. A taxa de concordância bruta (TCB) dos diagnósticos é dada por:

$$TCB = \frac{30+16}{78} = 0.5897 \text{ (58,97\%)}. \text{ O diagnóstico IH apresentou maior número de casos positivos que negativos, ao passo que na HE a diferença entre positivos e negativos foi pequena. (Tabela 20).}$$

Tabela 20: Índice de concordância entre HE e IH.

HE	IH				TOTAL	
	Positivo		Negativo		Freq.	Percent.
	Freq.	Percent.	Freq.	Percent.		
<b>Positivo</b>	30	38,5%	10	12,8%	<b>40</b>	<b>51,3%</b>
<b>Negativo</b>	22	28,2%	16	20,5%	<b>38</b>	<b>48,7%</b>
<b>TOTAL</b>	<b>52</b>	<b>66,7%</b>	<b>26</b>	<b>33,3%</b>	<b>78</b>	<b>100%</b>

A análise comparativa dos resultados positivos obtidos por IH e HE foi de 66,7% e 51,3% respectivamente. (Figura 20).



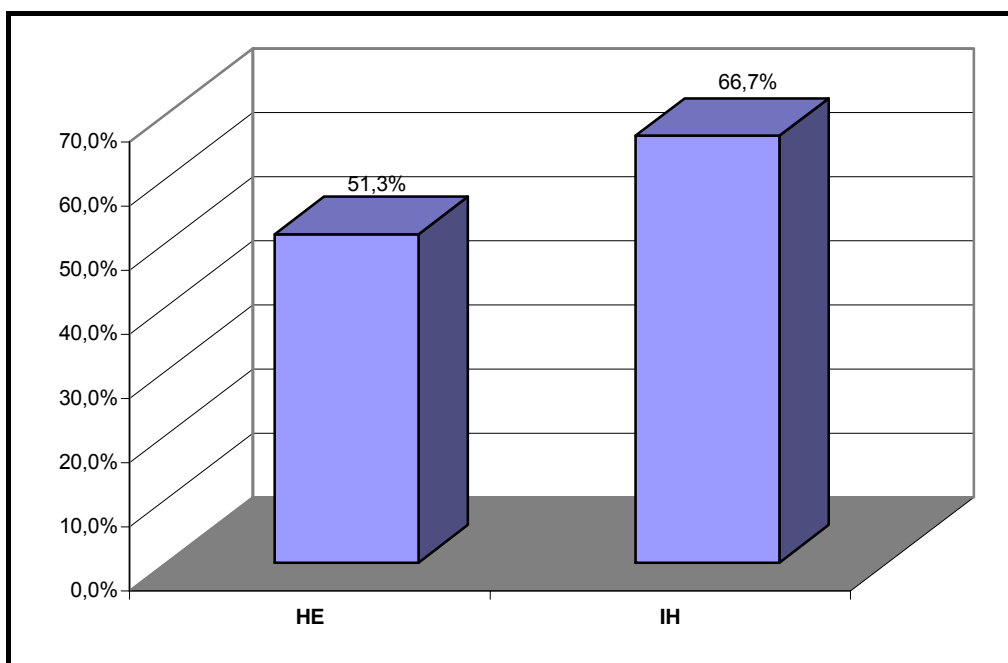


Figura 20: Análise comparativa dos resultados positivos obtidos por IH e HE.

### 5.3.1.3 Identificação e classificação dos parasitas por métodos moleculares, PCR:

Duas abordagens moleculares, com alvos distintos, foram avaliadas para o diagnóstico de leishmaniose cutânea americana (LCA) em pacientes do Pontal do Paranapanema utilizando-se os genes de rDNA e de G6PD. :

Para os genes de rDNA foram utilizados os primers:

1. SSU rDNA S4 / S12: as bandas foram de difícil visualização.

Esse resultado pode ser explicado pela qualidade do DNA.

Fragmento grande, 520pb, requer um template íntegro.

Portanto, os falsos negativos indicam que esse par de primers não constitui uma boa escolha para amostras fixadas e incluídas em parafina (Figura 21).

## 5. Resultados

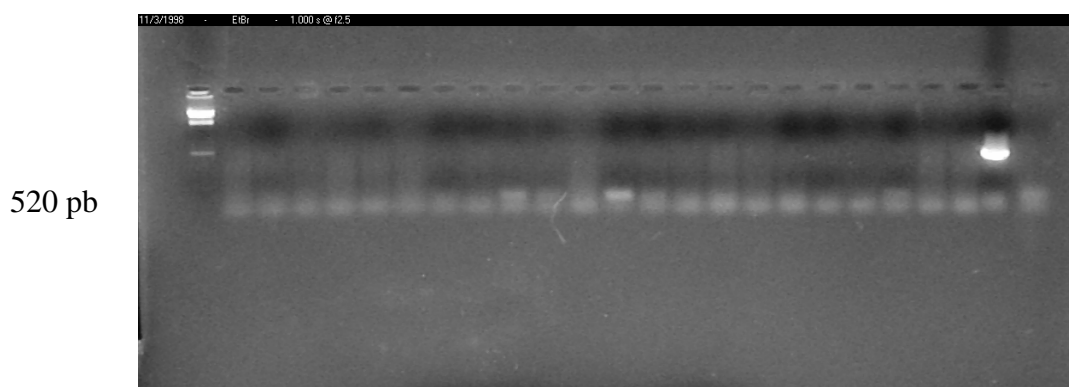


Figura 21: Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da PCR obtido com os oligonucleotídeos S4 e S12. M = marcador molecular  $\lambda$ /Hind III; canaletas de 1 a 21 = DNA de amostras de biópsias; 22 = controle negativo sem DNA; 23 = controle positivo DNA de L.

2. SSU rDNA – S17 / S18 -foi realizado em 74 casos, foram excluídos os 4 identificados como *L. (V). braziliensis* pelo G6PD. O produto da PCR com os oligonucleotídeos S17/S18 mostraram em 38 amostras, bandas de cerca de 490 bp (Figura 22). Foram encontrados através do seqüenciamento, 06 amostras de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; e 27 de *Leishmania (Viannia)* e em 05 não foi possível identificar a espécie através do seqüenciamento (Figura 23).

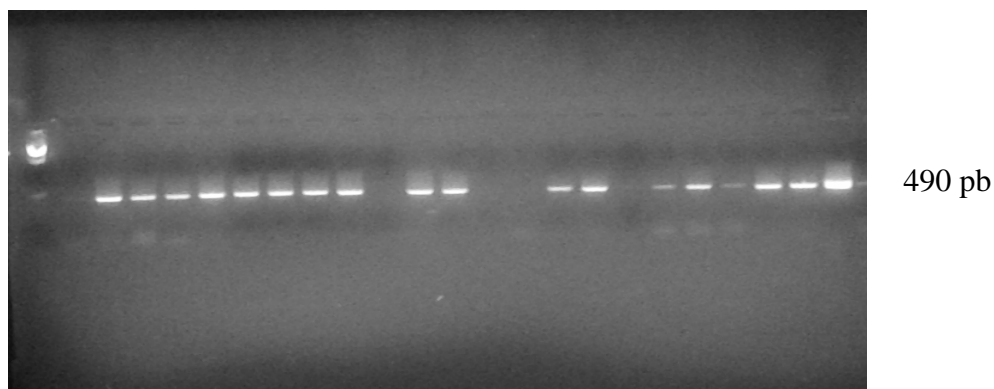


Figura 22: Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da PCR obtido com os oligonucleotídeos S17 e S18.

Quando se analisa um fragmento menor, a qualidade do DNA interfere menos nos resultados. Além disso, o fato de haver grande quantidade de cópias no DNA da *Leishmania* pode também favorecer o resultado.

organismos	rDNA seqüência			
	posição do nucleotídeo			
	1708	1714	1721	1727
<i>L.(L.) amazonensis</i>	<b>G A A T T G C C C A T A G A A T A G C A</b>			
<i>L. (Viannia)</i>	<b>G A A T T G T C C A T A G G A T A G C A</b>			

Figura 23: Seqüências de nucleotídeos determinadas para o produto da “nested” – PCR de DNA das amostras alinhadas com as seqüências de cepas de referência do SSU rDNA, conforme descrito por ULIANA et al. (1994), permitindo a identificação da espécie de *Leishmania*.

### 3. Para o Gene G6PD

foram utilizados os primers: ISVC/ISVB: todas as 78 amostras foram submetidas a esse par de primers, a fim de identificar a espécie *Leishmania (V.) braziliensis*. Através dessa PCR foram identificadas 4 amostras como *Leishmania (V.) braziliensis* (Figura 24).

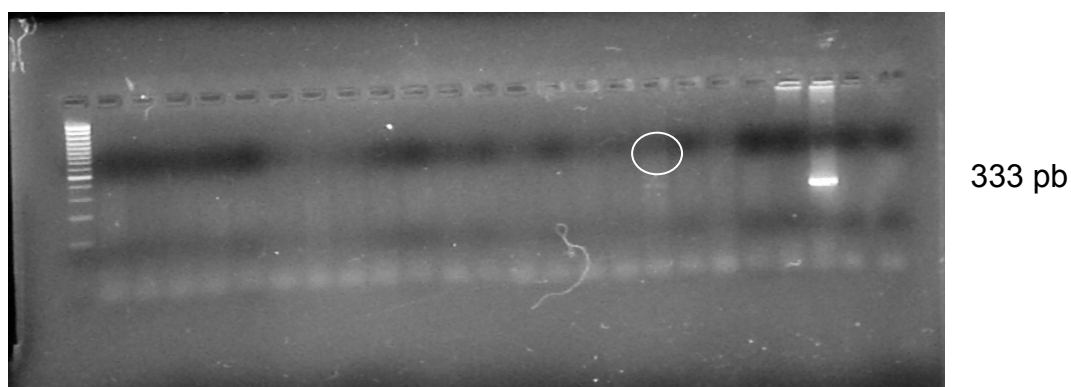


Figura 24: Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da PCR obtido com os oligonucleotídeos ISVC ISVB.

## 5. Resultados

Esse resultado mostra que além do fato do gene G6PD ser de cópia única no genoma da *Leishmania*, a qualidade do DNA pode ter interferido no resultado.

Os resultados gerais da PCR mostraram que 53,8% de casos foram positivos e 46,2% negativos, conforme a Tabela 21 e Figura 25.

Tabela 21: Resultados gerais da PCR.

PCR	Freq.	Percent.
Positivo	42	53,8%
Negativo	36	46,2%
<b>Total</b>	<b>78</b>	<b>100%</b>

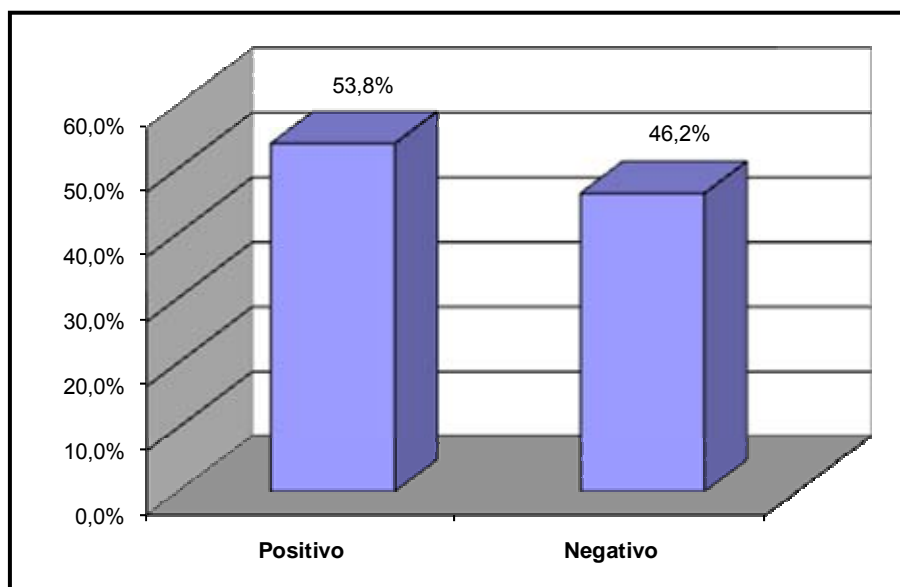


Figura 25: Resultados gerais da PCR.

Quando avaliamos a relação entre indivíduos do sexo masculino e feminino e a PCR, pelo teste qui-quadrado temos que,  $\chi^2_{cal} = 0.0687$  gl = 1,

## 5. Resultados

p-value = 0.7933, ou seja, como p-value > 0.05, podemos afirmar que não existe associação entre diagnóstico PCR e sexo (Tabela 22 e Figura 26). A razão de chances estimada é de RC = 0.8814424, ou seja, se o resultado fosse significativo, poderíamos afirmar que a chance do indivíduo do sexo masculino apresentar PCR positivo em relação ao PCR negativo seria de 0.8814424 vezes maior que a do indivíduo do sexo feminino.

Tabela 22: Associação entre sexo do indivíduo e a técnica da PCR.

SEXO/PCR	POSITIVO		NEGATIVO		TOTAL	
	Freq.	Percent.	Freq.	Percent.	Freq.	Percent.
<b>MASCULINO</b>	28	35,9%	25	32,1%	53	67,9%
<b>FEMININO</b>	14	17,9%	11	14,1%	25	32,1%
<b>TOTAL</b>	<b>42</b>	<b>53,8%</b>	<b>36</b>	<b>46,2%</b>	<b>78</b>	<b>100%</b>

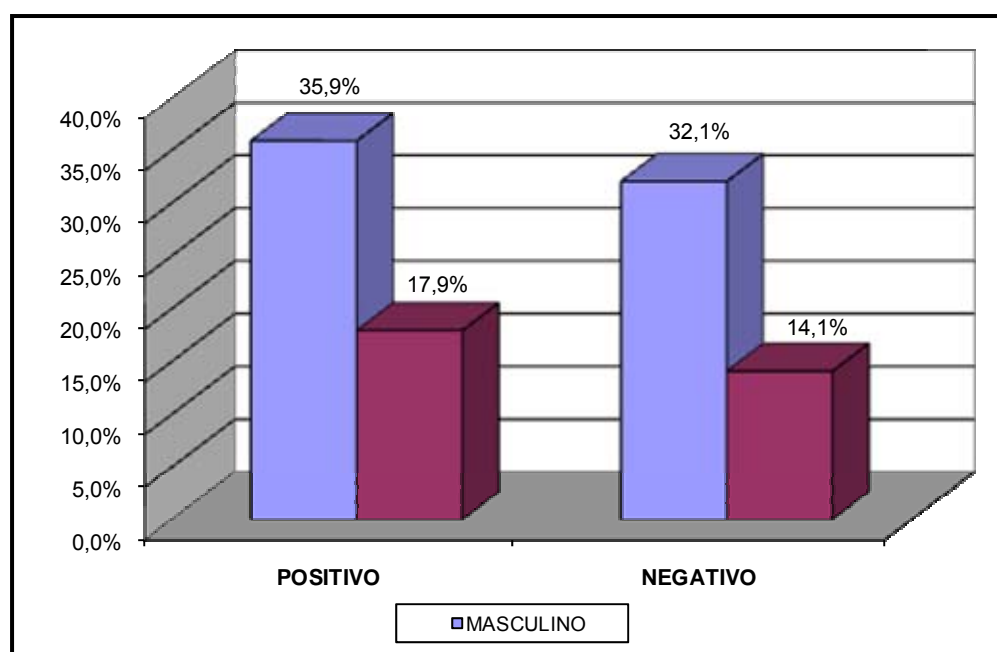


Figura 26: Associação entre sexo do indivíduo e a técnica da PCR.

## 5. Resultados

Os níveis de identificação, quando se utiliza a PCR e o seqüenciamento, mostram que 34,6% dos casos foram caracterizados como pertencentes ao subgênero *Viannia*, o que sugere a possibilidade de haver outros casos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* na região (Figura 27).

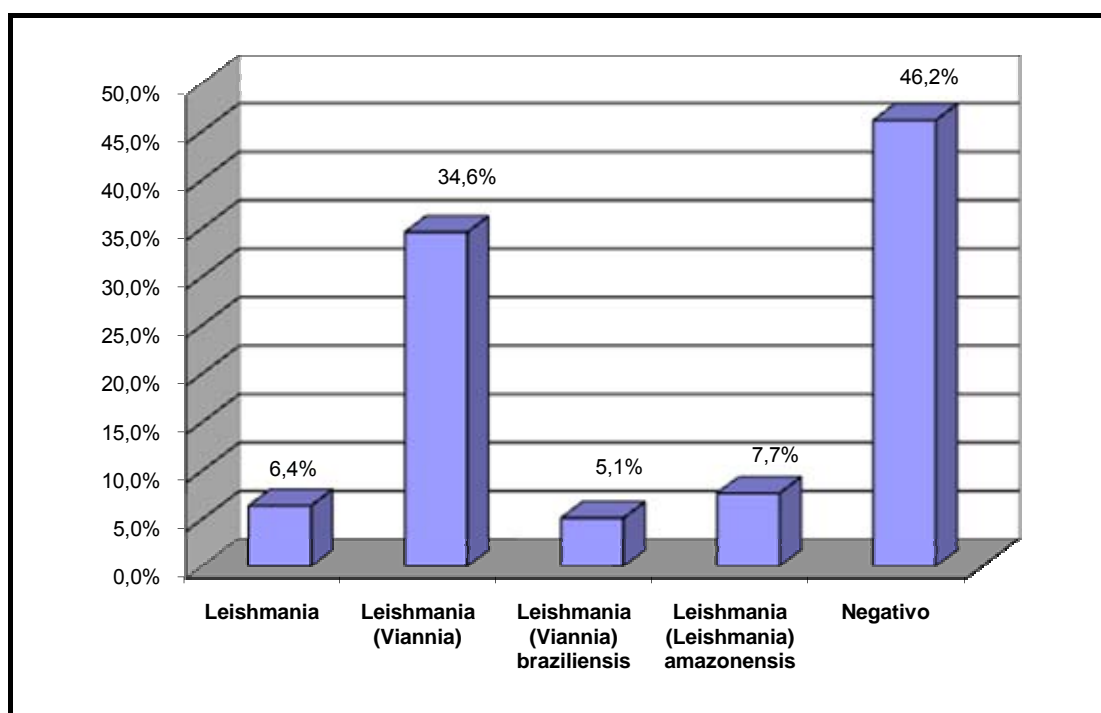


Figura 27: Níveis de caracterização utilizando PCR e seqüenciamento.

Ao se verificar se existe diferença significativa entre os níveis de identificação (*Leishmania*, *Leishmania (Viannia)*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*) desconsiderando o nível negativo, pois este já foi comparado com o positivo. Usando o teste Qui-quadrado temos que  $\chi^2_{cal} = 34.7619$ ,  $gl = 3$ ,  $p\text{-value} = 0,0001368$ , como  $p\text{-value} < 0,05$ , a diferença entre os níveis de identificação é significativa, havendo uma maior concentração no grupo do subgênero *Viannia*.

#### 5.3.1.4 Avaliação da taxa de concordância entre HE e PCR

Ao avaliarmos o índice de concordância entre os testes da PCR e HE, verificamos que o índice de concordância de positividade foi de 30,8% e de negatividade foi de 25,6%.

Pelo teste qui-quadrado, temos que  $\chi^2_{cal} = 1.2511$ , gl =1, p-value =0.2633 , ou seja , como p-value > 0.05, ou seja, não existe associação forte entre os diagnósticos HE e PCR. A taxa de concordância bruta (TCB) dos diagnósticos é dada por:  $TCB = \frac{24 + 20}{78} = 0.5641$  (56,41%).

Os diagnósticos pela PCR e HE apresentaram valores quantitativos semelhantes de casos positivos e negativos (Tabela 23 e Figura 28).

Tabela 23: Avaliação do nível de concordância entre HE e PCR.

HE	PCR				TOTAL	
	Positivo		Negativo		Freq.	Percent.
	Freq.	Percent.	Freq.	Percent.		
<b>POSITIVO</b>	24	30,8%	16	20,5%	<b>40</b>	<b>51,3%</b>
<b>NEGATIVO</b>	18	23,1%	20	25,6%	<b>38</b>	<b>48,7%</b>
<b>TOTAL</b>	<b>42</b>	<b>53,8%</b>	<b>36</b>	<b>46,2%</b>	<b>78</b>	<b>100%</b>

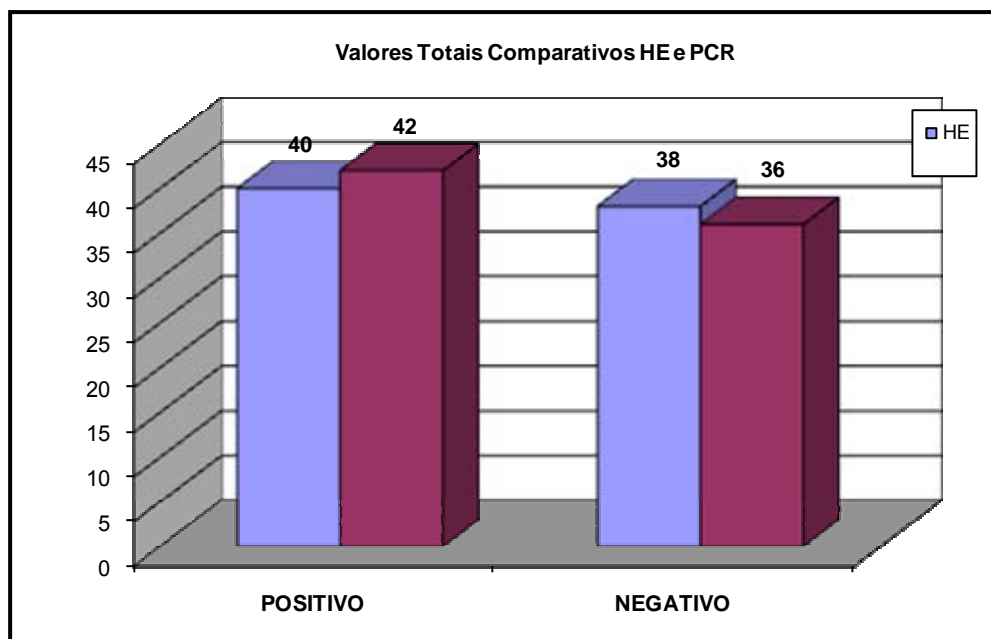


Figura 28: Avaliação do nível de concordância entre HE e PCR.

Ao analisarmos o número total de casos positivos e negativos no HE, verificamos que dos 40 casos positivos, 24 foram também positivos pela PCR e 16 negativos. Quando realizamos essa análise para comparar o índice total de casos negativos no HE com o PCR, observamos que, dos 38 casos negativos no HE, 18 foram positivos no PCR (Figura 29).



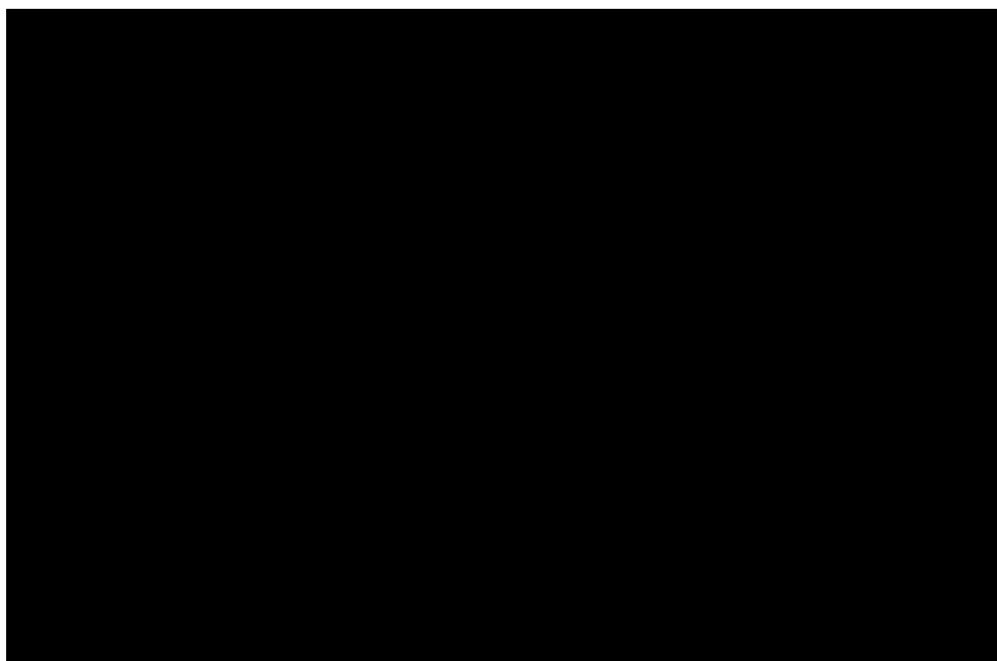


Figura 29: Relação dos resultados da PCR e HE.

#### 5.3.1.5 - Avaliação da taxa de concordância entre IH e PCR

Ao avaliarmos os resultados da IH e da PCR, verificamos que o índice de concordância de positividade foi de 35,9% e de negatividade foi de 15,4%. Pelo teste qui-quadrado, temos que  $\chi^2_{cal} = 0$ , gl =1, p-value =1, ou seja, como p-value > 0.05, ou seja, não existe associação entre os diagnósticos IH e PCR. A taxa de concordância bruta (TCB) dos diagnósticos é dada por:  $TCB = \frac{28+12}{78} = 0.5128$  (51,28%) (Tabela 24 e Figura 30).

## 5. Resultados

Tabela 24: Avaliação do nível de concordância entre IH e PCR.

IH	PCR				TOTAL	
	Positivo		Negativo		Freq.	Percent.
	Freq.	Percent.	Freq.	Percent.		
<b>Positivo</b>	28	35,9%	24	30,8%	<b>52</b>	<b>66,7%</b>
<b>Negativo</b>	14	17,9%	12	15,4%	<b>26</b>	<b>33,3%</b>
<b>TOTAL</b>	<b>42</b>	<b>53,8%</b>	<b>36</b>	<b>46,2%</b>	<b>78</b>	<b>100%</b>

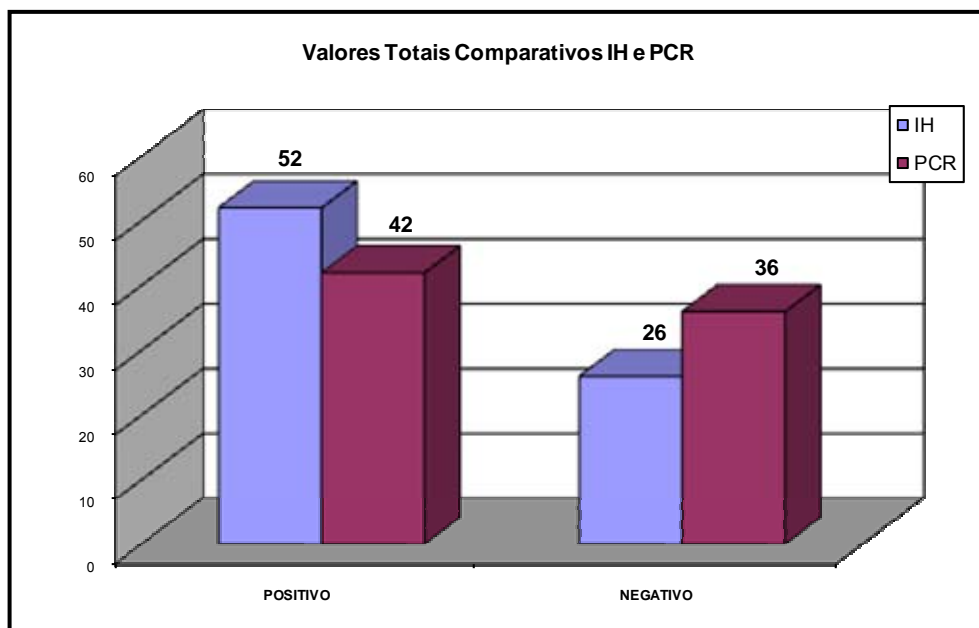


Figura 30: Avaliação do nível de concordância entre IH e PCR.

Ao analisarmos o número total de casos positivos e negativos na IH, verificamos que dos 52 casos positivos, 28 foram também positivos pela PCR e 16 negativos. Quando realizamos essa análise para comparar o índice total de casos negativos na IH com a PCR, observamos que, dos 26 casos negativos na IH, 14 foram positivos na PCR (Figura 31).

## 5. Resultados

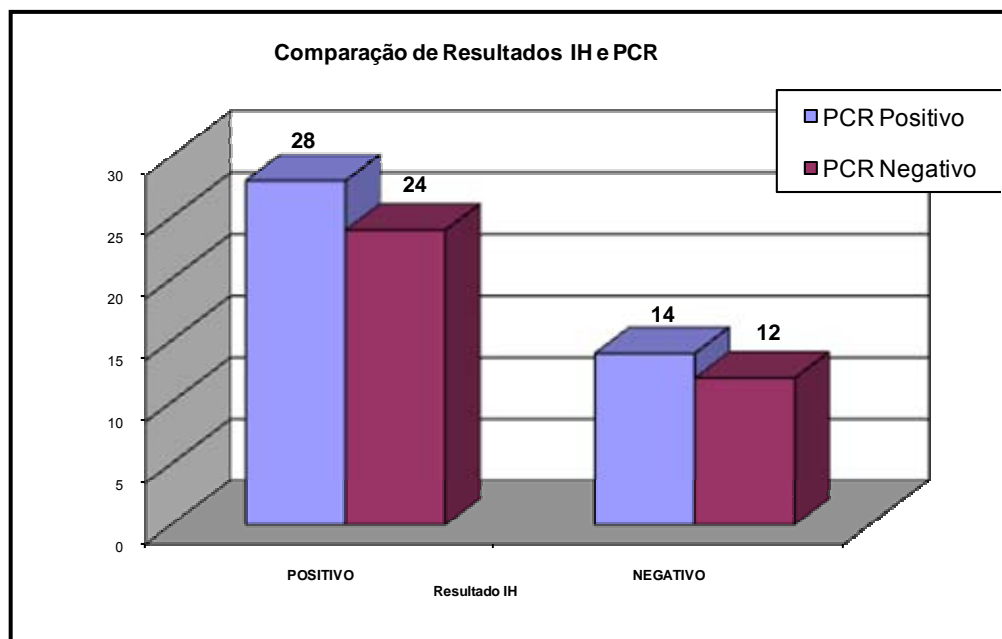


Figura 31: Comparação dos resultados pela PCR e IH.

Ao correlacionarmos as técnicas PCR, HE e IH, verificamos que o maior índice de concordância foi entre HE e IH com 58,97%, em relação a PCR a concordância maior foi HE e PCR com 56,41%. (Tabela 25).

Tabela 25: Taxas de concordância entre HE, IH e PCR.

Comparações	p-value(*)	Taxa de concordância
HE x IH	0,1092	58,97%
HE x PCR	0,2633	56,41%
IH x PCR	1,0000	51,28%

Na Tabela 26, podemos observar os resultados gerais obtidos através das técnicas utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose.

## 5. Resultados

Tabela 26: Comparativo entre HE, IH e PCR.

				PCR			
				Positivo		Negativo	
<b>HE</b>	Positivo	40	51,0%	24	60,0%	16	40,0%
	Negativo	38	49,0%	18	47,0%	20	53,0%
<b>IH</b>	Positivo	52	67,0%	28	54,0%	24	46,0%
	Negativo	26	33,0%	14	54,0%	12	46,0%

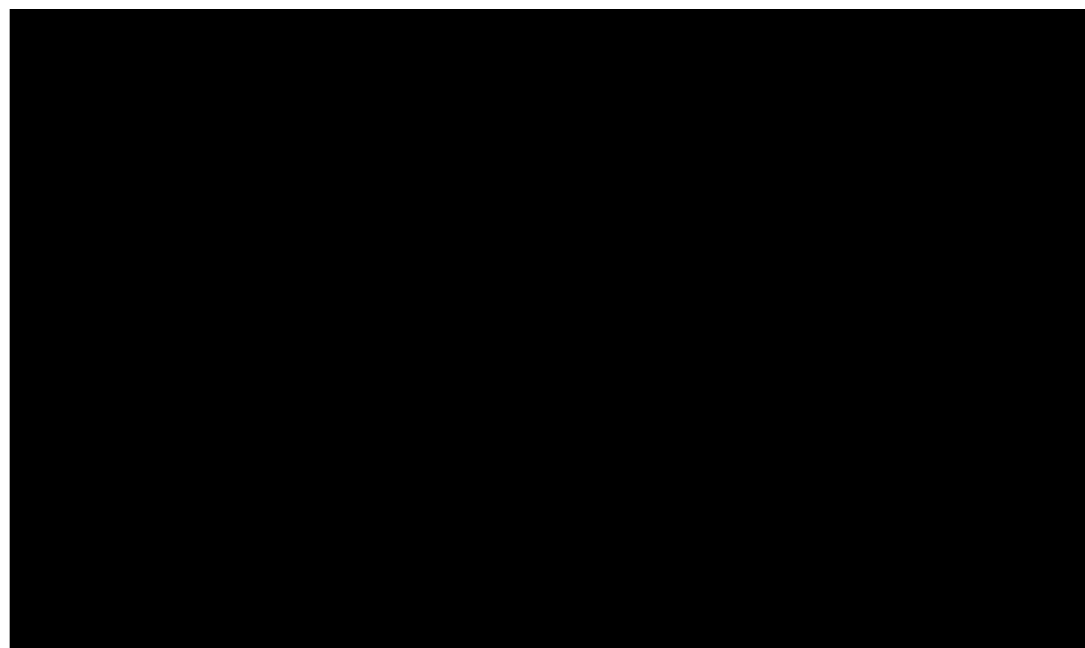


Figura 32: Comparativo acumulado entre HE, IH e PCR.



## 6 DISCUSSÃO

As notificações sobre a ocorrência de leishmaniose cutânea na região de Presidente Prudente mostram que a doença continua ocorrendo na região. Em 2006 foram 20 casos notificados. (2007, [cve.saúde.sp.gov.br](http://cve.saúde.sp.gov.br)). Alessi, 2003, mostrou que nas reservas de matas, particularmente no Parque Estadual do Morro do Diabo, existem condições de transmissão autóctone da doença. Os dados do trabalho mostraram que o número de casos humanos notificados anualmente, apesar das oscilações, indica que existem condições estáveis de transmissão na região.

A ocorrência da LCA no Pontal do Paranapanema parece estar relacionada ao processo de ocupação rural que vem ocorrendo nessas áreas. Ao longo dos últimos anos, houve um movimento importante de invasões nos municípios, para a criação de assentamentos realizados pelo Governo Federal. Atualmente, o Instituto de Terras de São Paulo (ITESP) administra 93 assentamentos no Pontal, que corresponde a 4.420 famílias (INCRA, 2007). Além disso, existem 56 acampamentos do MST, que ocorrem de forma desordenada, provocando alterações ambientais, favorecendo o aparecimento de pequenos focos de leishmaniose.

GOMES (1992), ao analisar a LCA no Estado de São Paulo, observou distribuição por todas as faixas etárias e ambos os sexos. No presente trabalho, os dados mostraram risco maior para o sexo masculino (67,9%). Estes dados são semelhantes aos encontrados por GARCIA et al. (2005),

em Ribeirão Preto, NAME et al. (2005), em Brasília, e MARTINS et al. (2004), em Buriticupu – MA, que registraram maior incidência em indivíduos do sexo masculino com 75%, 65,6% e 68%, respectivamente. Este fato pode estar ligado ao tipo de atividade desenvolvida pelo homem na região. Entretanto, ÇULHA e AKÇALI (2006), em Hatay, Turquia, registraram maior incidência em mulheres (67,5%).

A transmissão ocorreu em todas as faixas etárias, mas 70,5% estavam na faixa de 20 a 49 anos de idade. Essa distribuição, aliada ao número de casos do sexo masculino, sugere que a transmissão preferencial é extradomiciliar, em indivíduos que apresentam exposição ocupacional ou que são moradores de zonas rurais, como os assentados e acampados. Estes resultados são semelhantes aos de CASTRO et al. (2002), na região Norte do Estado do Paraná, que encontraram 70,8% dos casos notificados na faixa de 15 a 49 anos de idade. GUERRA et al. (2006), em Manaus, AM, verificaram que a maioria dos casos de leishmaniose cutânea americana ocorreu em pacientes jovens do sexo masculino, com predomínio entre 10 e 39 anos.

Os exames clínicos caracterizaram a doença como apresentando, preferencialmente, lesões ulceradas e em locais expostos do corpo. Lesões mucosas foram observadas em baixa percentagem.

A forma clínica mais encontrada foi a cutânea com 92,3% e a cutânea-mucosa com 7,7% dos casos. Esses dados coincidem com os de outros estudos, como o de GARCIA et al. (2005), em trabalho realizado no Estado de São Paulo, quando encontrou 79,6% dos pacientes com a forma cutânea.

MACHADO (2004), realizando trabalho no Estado de Santa Catarina, observou que a forma clínica mais freqüente foi a cutânea (50/56).

A leishmaniose cutânea-mucosa (LCM), apesar de ser um quadro clínico menos freqüente na leishmaniose, é geralmente mais agressiva para o paciente, pois apresenta a possibilidade de seqüelas graves, permanentes e está geralmente associada à *L.(V). braziliensis* (PASSOS, 1998). Os fatores que contribuem para que uma doença inicialmente cutânea evolua para essa forma tardia não são conhecidos, parece estar associada a lesões cutâneas primárias de evolução longa e tratamento inadequado (GONTIJO e CARVALHO, 2003). No grupo avaliado encontramos 7,7% da forma cutânea-mucosa. Percentagem baixa quando comparada aos resultados de GARCIA (2006), que estudando prontuários de pacientes hospitalizados em Ribeirão Preto, encontrou 23,3% de casos com comprometimento mucoso. Achado relacionado, provavelmente, ao atendimento hospitalar, em um centro de referência, onde os casos apresentam lesões mais graves. CORTE et al. (1996), em estudos realizados em Campinas, observaram em seus pacientes casos exclusivamente da forma cutânea. É possível que a dificuldade no diagnóstico da leishmaniose se deva, em parte, ao retardo na procura de assistência adequada, levando a crer que a busca ativa desses pacientes seria de grande importância para realização precoce do diagnóstico e conseqüentemente, início mais rápido do tratamento adequado.

O diagnóstico de LCA é feito pelo encontro de parasita na lesão. Segundo Alessi (2003), o encontro do parasita nas lesões, em pacientes



com diagnóstico clínico, foi feito em 56,82% dos casos, utilizando-se material de biópsia de arquivos dos laboratórios de patologia da região.

Dos 78 pacientes que realizaram biópsias para exame histopatológico a *Leishmania* foi detectada em 40 amostras (51.3%), nas lâminas coradas pela técnica da hematoxilina-eosina. Este resultado está próximo das observações de DORVAL et al. (2006), que encontraram 57,1% de positividade na pesquisa de parasita em biópsias da borda da lesão, em moradores do município de Bela Vista, Estado de Mato Grosso do Sul, enquanto que PENELA (2001), encontrou 30% de casos positivos, também em cortes histológicos corados pela HE. Para outros autores, a positividade foi variável; para CUBA CUBA et al. (1980) foi de 25,40%; para MAGALHÃES et al. (1986) foi de 63,07%; SOTTO et al. (1989) detectaram 20% de positividade e HEPBURN (2000) encontrou positividade de 70% em casos de infecção pela *L. major* na Arábia Saudita.

Analisando-se o material corado pela HE, as biópsias de pele examinadas mostraram que 24,4%, apresentaram raros, 19,2% moderados e 7,7% numerosos parasitas. Isto totalizou 51,3% de casos com diagnóstico conclusivo para leishmaniose cutânea. Em paciente com LCA atendidos no HC-FMRP-USP, a *Leishmania* foi detectada em 30,6% (GARCIA, 2005) pela histopatologia; já no Estado de Santa Catarina, a histopatologia detectou a presença de *Leishmania* em 80% das amostras analisadas (MACHADO, 2004).

Cortes histológicas adicionais foram utilizados para a realização das reações imunohistoquímicas utilizando-se anticorpos marcados com

imunoperoxidase para detecção do parasita. Os resultados das 78 amostras mostraram positividade de 66,7%. Este método tem sido utilizado com o objetivo de melhorar a eficiência do diagnóstico. PENELA (2001) encontrou positividade de 50,0% e PASSOS (2003) de 72,2%.

O anticorpo policlonal anti-*Leishmania* utilizado no método avidina-biotina-peroxidase é adequado para o diagnóstico parasitológico da LCA, mas não serve para a caracterização de espécies.

O índice de concordância entre as técnicas da HE e IH foi de 58,97%. Entretanto, 10 casos negativos na IH foram positivos na HE, e de 38 casos negativos na HE, 22 foram positivos na IH. Isto mostra que há necessidade de associação dos dois métodos.

A maioria dos casos apresentava quadro histopatológico compatível com infecção pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Nos casos negativos, onde não se observou o parasita, que correspondem a 43,18%, a plasmocitose representou um elemento indicativo da leishmaniose. Alguns casos mostraram parasitismo alto sugerindo a possibilidade de haver na região outras espécies, além da *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

A identificação das espécies de *Leishmanias* que ocorrem em áreas endêmicas é importante para a compreensão da doença. Apesar de a leishmaniose cutânea ser considerada uma entidade, existem diferentes formas clínicas agrupadas em: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Muco-Cutânea (LMC), Leishmaniose Cutânea Difusa Anérgica (LCDA) e as Leishmanioses Cutâneas Disseminadas Bordelines (LCDB), formas intermediárias entre a LCL e os pólos anérgicos e hiperérgicos, ou

seja, a LCD e a LMC respectivamente. Estas formas dependem da espécie que causa a infecção e das respostas nata e imune dos indivíduos. Além disto, as diferentes espécies apresentam diferentes fatores de virulência e mecanismo de evasão do sistema imune (SILVEIRA et al., 2004).

As lesões histopatológicas mostraram a seguinte distribuição: reação granulomatosa (RG) e reação granulomatosa com células gigantes (RGCG) foram encontradas em 71,8% (56/78) e 12,8% (10/78) das biópsias respectivamente. A reação granulomatosa com necrose (RGN) foi observada em 10,3% (8/78) dos casos e granuloma com necrose e células gigantes (RGNCG) apareceram em menor proporção, 5,1% (4/78). Resultados semelhantes foram obtidos por STOLF et al. (1993) que encontraram em suas amostras reação inflamatória granulomatosa com infiltrado linfoplasmocitário. BOER et al. (2006), relataram a presença de granulomas, células gigantes e plasmócitos em pacientes do Norte da Europa.

A tentativa de caracterização das espécies de *Leishmania* no Pontal do Paranapanema, através do isolamento do parasita pelas técnicas clássicas de cultura e inoculação em animal de laboratório, não foi possível pelas dificuldades próprias dos métodos e pela deficiência de estrutura local para a inoculação e cultura.

Neste trabalho, tentamos a identificação das espécies utilizando técnicas moleculares. Foi utilizada a técnica de PCR, visando o diagnóstico molecular da etiologia da infecção e a identificação das espécies. Em relação ao diagnóstico etiológico da amostra utilizada neste trabalho, apenas 53,8% das amostras foram positivas para a identificação do

parasita, valor superior ao encontrado na histopatologia que foi de 51,3% e inferior à imunohistoquímica que foi de 66,7%.

A amplificação pela PCR é um método sensível e específico na detecção, caracterização e identificação de *Leishmania sp* em amostras clínicas, reservatórios e vetores infectados (MULLER et al.; 2003).

A grande dificuldade da utilização da PCR tanto para o diagnóstico como para a identificação das espécies é o material disponível, já que não foi isolado parasita das lesões. O único material disponível era constituído de biópsia em blocos de parafina. Alguns estocados nos laboratórios de patologia da região, outros processados para diagnóstico histopatológico nestes laboratórios durante o estudo.

Os protocolos padrões para a reação de PCR nem sempre são apropriados para material conservado em blocos de parafina, e, portanto, deve-se levar em conta a adequação dos tampões, enzimas, além da qualidade da amostra do DNA e da especificidade da seqüência alvo a ser amplificada.

A positividade na PCR foi de 42 casos (53,8%), que é um resultado que diverge do encontrado por outros autores. MEDEIROS, RODRIGUES e ROSELINO (2002) obtiveram positividade em 81,5%, utilizando os primers SSU rDNA 13A e 13B para amplificação da região conservada do rDNA. GARCIA et al. (2005), estudando pacientes do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, com diagnóstico confirmado de LCA, obteve 81,6% de amostras positivas, utilizando primers específicos para seqüência de 120pb do rDNA. Entretanto, MACHADO (2004), em pacientes de Santa Catarina,

detectou através da histopatologia a presença de *Leishmania* em 80% dos casos enquanto a PCR, em imprint em papel de celulose, foi de 74,5%.

No presente estudo, a PCR mostrou resultados inferiores ao da literatura, muito provavelmente atribuídos à baixa carga parasitária ou à instabilidade dos fragmentos do DNA que podem agir como inibidores da DNA polimerase (WEIGLE et al. 2002).

Embora a PCR tenha detectado DNA de *Leishmania* em apenas 42 das 78 amostras, a técnica foi capaz de detectar 7 casos positivos onde a HE e a IH foram negativas.

O alvo utilizado para identificar seqüências específicas foi o gene G6PD, que é de cópia única no genoma da *Leishmania*, foram utilizados os oligonucleotídeos: G6PD-ISVC/ G6PD-ISVB, que são específicos para *L. (V.) braziliensis*, identificando quatro amostras positivas.

Utilizando-se rDNA com os primers SSU rDNA S17/S18, foi possível caracterizar, através do seqüenciamento, 27 (34,6%) amostras como sendo do subgênero *Viannia*. Talvez o fato, de utilizarmos um “primer” menor, tenha reduzido a possibilidade da DNA polimerase falhar ao completar a extensão. Os resultados dessas amostras sugerem a presença da *L.(V.) braziliensis*, uma vez que vários autores já relataram ser esta espécie o agente etiológico da região (CONDINO et al., 1998; FORATTINI et al., 1976; NEVES et al., 2002). Entretanto, a ocorrência de outras espécies do subgênero *Viannia* não pode ser desconsiderada. Em Minas Gerais PASSOS et al. (1999), utilizando parasitas obtidos de cultura de fragmentos de lesão e primer de rDNA, encontraram 92,5% de amostras do subgênero

*Viannia* e 7,5% do subgênero *Leishmania* no diagnóstico de 53 pacientes com LCA. De 28 cães pesquisados no Planalto da Bodoquena, Mato Grosso do Sul, utilizando S17/S18, 21 eram do subgênero *Leishmania* e 06 do subgênero *Viannia* (SAVANI, 2004).

Quando avaliamos os resultados das PCR com os pares de oligonucleotídeos SSU rDNA S4/S12, verificamos que o resultado foi pouco satisfatório, possivelmente o DNA obtido de 520 pb, não era adequado para esse par de primers.

Quando se usou rDNA e os oligonucleotídeos SSU rDNA S17 e S18, empregando o amplificado obtido com SSU rDNA S4 e S12, que foi seqüenciado, foram caracterizadas 06 amostras como *L. (L.) amazonensis*. Destas, 03 eram importadas de outro estado da região Centro-Oeste. Os três casos autóctones de infecção por *L. (L.) amazonensis* apresentaram a forma clínica cutânea. As biópsias desses pacientes foram processadas em 1998, 1999 e 2004, indicando que o tempo de permanência das amostras em parafina, não interferiu na qualidade da PCR. Segundo PASSOS (2003), as amostras incluídas em parafina conseguem manter sua integridade histológica por estarem preservadas em meio seco e sólido.

Este estudo identificou o primeiro caso de *L. (L.) amazonensis* na região, sugerindo condições de transmissão no Pontal. Estudos adicionais são necessários para a investigação do vetor *Lutzomyia flaviscutellata* e possíveis reservatórios na região próxima ao Morro do Diabo e em outros resquícios de floresta na região.

A *L. (L.) amazonensis* possui ciclo predominantemente silvestre, que se estabelece em roedores, com hábitos noturnos e pode ser encontrada tanto em floresta tropical primária quanto em floresta secundária (SHAW e LAINSON, 1987).

A *L. (L.) amazonensis* é capaz de produzir largo espectro de manifestações clínicas incluindo leishmaniose cutânea, leishmaniose borderline e a forma leishmaniose cutânea anérgica difusa, resistente aos tratamentos conhecidos (SILVEIRA et al. 2005). Daí a importância de sua identificação na região do Pontal do Paranapanema.

As abordagens moleculares avaliadas neste estudo reforçaram a necessidade da utilização de métodos combinados, SSU rDNA S17/S18 e G6PD, para o diagnóstico da LCA no Pontal do Paranapanema.

Os níveis de concordância da PCR com HE, que foram de 56,41% e da PCR com IH de 51,28% podem estar relacionados à presença de substâncias inibidoras durante as fases de anelamento e amplificação da PCR, que talvez não fossem removidas durante o preparo das amostras (BELLI et al., 1998). O DNA pode sofrer alterações quando está sendo extraído do tecido conservado, em formol e em parafina, podendo ser perdido durante o processo (AVILES et al., 1999).

Estes resultados sugerem que ainda não existe método de diagnóstico com resultado seguro, que possa ser usado isoladamente. Dados clínicos, epidemiológicos e a associação de métodos laboratoriais são necessários para o diagnóstico conclusivo da LCA. Estudo na Colômbia, com 165 pacientes com lesões sugestivas de LCA, comparando 07 métodos de

diagnóstico encontrou 67% de concordância entre todos os métodos (WEIGLE et al, 1987).

Avaliando-se os resultados obtidos nesse estudo, podemos verificar que dos 40 casos positivos pela HE, 24 também foram positivos pela PCR; porém, 16 destes, foram negativos pela PCR. Em contrapartida, das 38 amostras negativas na HE, 18 delas foram positivas pela PCR. Pela imunohistoquímica, do total de 26 amostras negativas, apenas 12 permaneceram negativas e 14 foram positivas na PCR; enquanto que, das 52 amostras positivas pela IH, 28 foram positivas e 24 negativas pela PCR. Esses resultados reforçam a idéia da necessidade de se associar os três métodos para o diagnóstico da LCA.

Apesar de termos identificado as espécies em apenas 12,8% das amostras, utilizando a PCR, demonstramos que este método é importante para investigação da leishmaniose na população do Pontal do Paranapanema. Demonstramos, também, a presença da *Leishmania (L.) amazonensis* na região. A taxa de positividade de 12,8% mostra a necessidade de se aprimorar esta técnica para obtenção de melhores resultados.





## 7 CONCLUSÕES

- Baseado nos dados epidemiológicos, a LCA ocorre predominantemente no sexo masculino, na faixa etária de 20 a 49 anos, a maioria em indivíduos das áreas rurais.
- A transmissão da parasitose pode ser enquadrada no padrão de risco ocupacional.
- A forma cutânea localizada foi predominante.
- A histopatologia foi caracterizada por lesões granulomatosas.
- As técnicas moleculares permitiram a detecção do DNA de *Leishmania* em biópsias incluídas em parafina.
- Foram identificadas as *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) sp*, no Pontal do Paranapanema.
- A *Leishmania (L.) amazonensis*, foi identificada pela primeira vez no Pontal do Paranapanema.
- Não há técnica considerada padrão para o diagnóstico etiológico da LCA, é necessária a associação da histopatologia, imunohistoquímica e PCR
- Diante da existência de *L. (L.) amazonensis* na região oeste do Estado, é necessário se realizar estudos da fauna de flebotomíneos e de possíveis reservatórios.



## 8. Anexos

## 8 ANEXOS

## Anexo 1

República Federativa do Brasil  
 Ministério da Saúde

**SINAN**  
 SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO

N°

FICHA DE INVESTIGAÇÃO **LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

<b>Dados Gerais</b>	1 Tipo de Notificação 2- Individual		2 Data da Notificação		
	3 Município de Notificação		Código (IBGE)		
	4 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)		Código		
	5 Agravado <b>LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA</b>		Código (CID10) B 5 5 - 2	6 Data do Diagnóstico	
<b>Dados do Caso</b>	7 Nome do Paciente		8 Data de Nascimento		
	9 (ou) Idade D - dias M - meses A - anos	10 Sexo M - Masculino F - Feminino I - Ignorado	11 Raça/Cor 1-Branca 2-Preta 3-Amarela 4-Parda 5-Indígena 9-Ignorado	12 Escolaridade (em anos de estudo concluídos) 1-Nenhuma 2-De 1 a 3 3-De 4 a 7 4-De 8 a 11 5-De 12 e mais 6- Não se aplica 9-Ignorado	
	13 Número do Cartão SUS		14 Nome da mãe		
	15 Logradouro (rua, avenida,...)		Código	16 Número	
	17 Complemento (apto., casa, ...)		18 Ponto de Referência		19 UF
<b>Dados de Residência</b>	20 Município de Residência		Código (IBGE)	Distrito	
	21 Bairro		Código (IBGE)	22 CEP	
	23 (DDD) Telefone		24 Zona 1 - Urbana 2 - Rural 3 - Urbana/Rural 9 - Ignorado		25 País (se residente fora do Brasil)
			Código		
	<b>Dados Complementares do Caso</b>				
<b>Antecedentes Epidemiológicos</b>	26 Data da Investigação		27 Ocupação / Ramo de Atividade Econômica		
	28 Destocamento (datas e locais frequentados no período de seis meses anterior ao início dos sinais e sintomas)				
	Data	Local/Município	UF	País	
<b>Dados Clínicos</b>	29 Presença de Lesão 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		<input type="checkbox"/> Cutânea <input type="checkbox"/> Mucosa	30 Em Caso de Presença de Lesão Mucosa, Há Presença de Cicatrizes Cutâneas 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado	
	31 Parasitológico Direto 1 - Positivo 2 - Negativo 3 - Não Realizado 9 - Ignorado		32 IRM 1 - Positivo 2 - Negativo 3 - Não Realizado 9 - Ignorado	33 Histopatologia 1 - Encontro do Parasita 2 - Compatível 3 - Não Compatível 4 - Não Realizado 9 - Ignorado	
<b>Clas. Caso</b>	34 Tipo de Entrada 1 - Caso Novo 2 - Recidiva 9 - Ignorado		35 Forma Clínica 1 - Cutânea 2 - Mucosa		
<b>Tratamento</b>	36 Data do Início do Tratamento		37 Droga Inicial Administrada 1 - Antimonial Pentavalente 2 - Anfotericina b 3 - Pentamidina 4 - Outras 5 - Não Utilizada		
	38 Peso Kg	39 Dose Prescrita em mg/kg/dia Sb <sup>5</sup> 1 - < 10 2 - >= 10 < 15 3 - 15 4 - >15 < 20 5 - 20 6 - >20		40 Nº Total de Ampolas Prescritas Ampolas	
	41 Outra Droga Utilizada, na Falência do Tratamento Inicial 1 - Antimonial Pentavalente 2 - Anfotericina b 3 - Pentamidina 4 - Outros 5 - Não Se Aplica				



**ANEXO 2**

Nº	Ano	Sexo	Idade	F. clínica	Nº de lesões	HE	IH	Amast.	Identif.	G6PD ISVC/ICVB	RDNA- S17S18(seq)
1	2003	M	47	Cutânea	uma	<b>NEG</b>	<b>NEG</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L.(Viannia)</i>
2	1996	M	38	Cutânea	Uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	Raros	Neg	neg	Neg
3	1999	M	27	*****	uma ou mais	<b>POS</b>	<b>POS</b>	+++	<i>L.(L.)amazonensis</i>	neg	<i>L.(L.)amazonensis</i>
4	1997	M	22	Cutânea	uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	++	Neg	neg	Neg
5	1997	F	47	Cutânea	Uma	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L.(Viannia)</i>
6	2001	M	42	*****	Uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	Raros	Neg	neg	Neg
7	2003	M	39	Cutânea	Uma	<b>NEG</b>	<b>NEG</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L.(Viannia)</i>
8	1999	F	23	C.mucosa	uma	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		Neg	neg	Neg
9	2001	M	39	Cutânea	uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	+	Neg	neg	neg
10	1997	M	57	Cutânea	Uma	<b>POS</b>	<b>NEG</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L.(Viannia)</i>

## 8. Anexos

Nº	Ano	Sexo	Idade	F. clínica	Nº de lesões	HE	IH	Amast.	Identif.	G6PD ISVC/ICVB	RDNA- S17S18(seq)
11	2002	M	47	Cutânea	Uma	<b>NEG</b>	<b>NEG</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L.(Viannia)</i>
12	2003	M	69	Cutânea	Uma	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		<i>L.(L.)amazonensis</i>	neg	<i>L.(L.)amazonensis</i>
13	2002	M	44	Cutânea	uma	<b>POS</b>	<b>NEG</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L. (Viannia)</i>
14	2002	F	27	Cutânea	Uma	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L. (Viannia)</i>
15	1999	M	63	Cutânea	Uma	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L. (Viannia)</i>
16	2003	M	51	Cutânea	uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	++	<i>L.(V.)brasiliensis</i>	<i>L.(V.)brasiliensis</i>	<i>L. (Viannia)</i>
17	2002	M	58	Cutânea	Uma ou mais	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		Neg	neg	Neg
18	1996	F	29	Cutânea	uma	<b>NEG</b>	<b>NEG</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L. (Viannia)</i>
19	2002	M	48	Cutânea	Uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	+	<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L. (Viannia)</i>
20	2002	M	62	Cutânea	Uma	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		Neg	neg	Neg
21	1996	M	68	Cutânea	Uma	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		Neg	neg	Neg

## 8. Anexos

Nº	Ano	Sexo	Idade	F. clínica	Nº de lesões	HE	IH	Amast.	Identif.	G6PD ISVC/ICVB	RDNA- S17S18(seq)
22	1995	M	54	Cutânea	uma	<b>POS</b>	<b>NEG</b>		<b>Rep.seq.</b>	neg	<b>Leishmania(rep seq)</b>
23	2003	M	14	*****	uma	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		Neg	neg	neg
24	1996	M	9	*****	Uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L. (Viannia)</i>
25	1996	M	13	Cutânea	Uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	++	<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L. (Viannia) rep. Seq</i>
26	1996	F	31	C.mucosa	Uma	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L. (Viannia)</i>
27	1996	F	31	C.mucosa	uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L. (Viannia)</i>
28	1996	M	16	Cutânea	uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	+	<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L. (Viannia)</i>
29	2002	F	39	Cutânea	Uma	<b>NEG</b>	<b>NEG</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L. (Viannia)</i>
30	2002	M	43	*****	Uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L. (Viannia)</i>
31	1997	M	53	Cutânea	Uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>		<i>Leishmania</i>	neg	<i>Leishmania</i>



## 8. Anexos

Nº	Ano	Sexo	Idade	F. clínica	Nº de lesões	HE	IH	Amast.	Identif.	G6PD ISVC/ICVB	RDNA- S17S18(seq)  <i>Rep.seq</i>
32	1997	F	29	Cutânea	uma	<b>NEG</b>	<b>NEG</b>		Neg	neg	Neg
33	1999	M	24	Cutânea	uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	Raros	Neg	neg	Neg
34	1997	M	72	Cutânea	Uma	<b>POS</b>	<b>NEG</b>		<i>Leishmania</i>	neg	<i>Leishmania</i>  <b>Rep.seq</b>
35	1997	F	47	Cutânea	Uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>		Neg	neg	Neg
36	1997	M	33	Cutânea	Uma	<b>NEG</b>	<b>NEG</b>		Neg	neg	Neg
38	1997	M	49	Cutânea	uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>		Neg	neg	Neg
40	1997	F	71	Cutânea	Uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>		Neg	neg	Neg
41	1996	F	53	Cutânea	uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	+	<i>L.(L.)amazonensis</i>	neg	<i>L.(L.)amazonensis</i>
42	1997	F	41	Cutânea	Uma ou mais	<b>NEG</b>	<b>NEG</b>		Neg	neg	Neg

## 8. Anexos

Nº	Ano	Sexo	Idade	F. clínica	Nº de lesões	HE	IH	Amast.	Identif.	G6PD ISVC/ICVB	RDNA- S17S18(seq)
43	2002	M	27	Cutânea	uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	Raros	Neg	neg	Neg
44	2002	M	19	Cutânea	Uma	<b>POS</b>	<b>NEG</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L. (Viannia)</i>
45	1997	F	31	*****	Uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	++	<i>Leishmania</i>	neg	<i>Leishmania</i> <b>rep.seq</b>
46	1997	M	58	Cutânea	Uma	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		Neg	neg	Neg
47	1996	F	26	Cutânea	uma	<b>NEG</b>	<b>NEG</b>		Neg	neg	neg
48	1996	M	33	Cutânea	uma	<b>POS</b>	<b>NEG</b>		Neg	neg	neg
49	1996	F	22	Cutânea	Uma	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		Neg	neg	neg
50	1998	M	49	Cutânea	Uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	+	Neg	neg	neg
51	1998	M	49	Cutânea	Uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	+	Neg	neg	neg
52	1998	F	33	Cutânea	uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	Raros	Neg	neg	neg
53	2001	M	23	Cutânea	uma	<b>NEG</b>	<b>NEG</b>		Neg	neg	neg

## 8. Anexos

Nº	Ano	Sexo	Idade	F. clínica	Nº de lesões	HE	IH	Amast.	Identif.	G6PD ISVC/ICVB	RDNA- S17S18(seq)
54	1996	M	36	Cutânea	Uma	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		Neg	neg	neg
55	2001	F	30	Cutânea	Uma	<b>NEG</b>	<b>NEG</b>		Neg	neg	neg
56	2002	M	41	C.mucosa	Uma	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		Neg	neg	neg
57	2004	M	49	Cutânea	uma	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		<i>L.(V.)brasiliensis</i>	<i>L.(V.)brasiliensis</i>	L.(Viannia)
58	2004	M	53	Cutânea	Uma ou mais	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		<i>L.(L.)amazonensis</i>	neg	<i>L.(L.)amazonensis</i>
59	2004	F	32	*****	uma	<b>POS</b>	<b>NEG</b>		<i>Leishmania</i>	neg	<i>Leishmania rep. seq</i>
60	2004	M	28	Cutânea	Uma	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L.(Viannia)</i>
61	2004	M	31	*****	Uma	<b>POS</b>	<b>NEG</b>	+	Neg	neg	Neg
62	2004	F	20	C.mucosa	Uma	<b>NEG</b>	<b>POS</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L.(Viannia)</i>
63	2004	M	43	Cutânea	uma	<b>POS</b>	<b>NEG</b>	+	<i>L.(V.)brasiliensis</i>	<i>L.(V.)brasiliensis</i>	<i>L.(Viannia)</i>

## 8. Anexos

Nº	Ano	Sexo	Idade	F. clínica	Nº de lesões	HE	IH	Amast.	Identif.	G6PD ISVC/ICVB	RDNA- S17S18(seq)
64	2002	M	47	Cutânea	Uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	Raros	<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L.(Viannia)</i>
65	2001	F	29	Cutânea	Uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L.(Viannia)</i>
66	2001	M	32	Cutânea	uma	<b>POS</b>	<b>POS</b>	++	<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L.(Viannia)</i>
67	2001	F	41	Cutânea		<b>NEG</b>	<b>NEG</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L.(Viannia)</i>
68	2002	M	47	Cutânea		<b>NEG</b>	<b>NEG</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L.(Viannia)</i>
69	2002	F	43	*****		<b>NEG</b>	<b>POS</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L.(Viannia)</i>
70	2002	M	32	Cutânea		<b>POS</b>	<b>POS</b>	++	<i>L.(L.)amazonensis</i>	neg	<i>L.(L.)amazonensis</i>
71	2003	M	52	Cutânea		<b>NEG</b>	<b>POS</b>		Neg	neg	Neg
72	1995	M	26	Cutânea		<b>NEG</b>	<b>NEG</b>		Neg	neg	Neg
73	1997	M	31	*****		<b>NEG</b>	<b>POS</b>		Neg	neg	Neg
74	1998	M	49	Cutânea		<b>POS</b>	<b>POS</b>	+	<i>L.(L.)amazonensis</i>	neg	<i>L.(L.)amazonensis</i>
75	1998	F	43	Cutânea		<b>NEG</b>	<b>NEG</b>		Neg	neg	Neg

## 8. Anexos

Nº	Ano	Sexo	Idade	F. clínica	Nº de lesões	HE	IH	Amast.	Identif.	G6PD ISVC/ICVB	RDNA- S17S18(seq)
76	2002	M	55	C.mucosa		<b>NEG</b>	<b>POS</b>		<i>L.(Viannia)</i>	neg	<i>L.(Viannia)</i>
77	2003	F	61	Cutânea		<b>POS</b>	<b>POS</b>	+	<i>L.(V.)brasiliensis</i>	<i>L.(V.)brasiliensis</i>	<i>L.(Viannia)</i>
78	2001	M	45	*****	Uma ou mais	<b>NEG</b>	<b>NEG</b>		Neg	neg	Neg
79	2000	F	53	*****		<b>POS</b>	<b>NEG</b>	++	Neg	neg	Neg
80	1996	M	32	Cutânea		<b>POS</b>	<b>POS</b>		Neg	neg	neg

- 
- 
- 
- 
- 
- 

## REFERÊNCIAS

---

## 9 Referências

Alessi CAC. Leishmaniose Tegumentar Americana no Pontal do Paranapanema – SP: aspectos epidemiológicos, ecológicos, entomológicos, clínicos e patológicos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Almeida RA, Diferentes modos de organização de explorações familiares no Pontal do Paranapanema: reassentamento Rosana e assentamento Santa Clara. São Paulo [dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNESP; 1996.

Andrade LEC. Princípio de biologia molecular e suas aplicações em medicina. Rev Ass Méd Brasil. 1993;39:175-86.

Andrade MS, Brito MEF, da Silva ST, Lima BS, Almeida EL, Albuquerque EL, Marinho Júnior JF, Ishikawa E, Cupolillo E, Brandão-Filho SP. 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(3):229-33.

Aragão HB. Transmissão da Leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. Braz Med. 1922; 1:129-30.

Ashford RW, Desjeux P, De Raadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. Parasitol Today. 1992;8(3):104-5.

Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR detection and identification of Leishmania parasite in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. J Parasitol 1999;85(2):181-7.

Azulay RD, Salgado U. Surto epidêmico de Leishmaniose tegumentar observado em pára-quedistas do exército na Amazônia. Med Cutan Iber Lat Am. 1966;4:346-52.

Barbosa JER. Dados estatísticos sobre casos de leishmaniose das mucosas observados no serviço de Otorrinolaringologia da Santa Casa de São Paulo. Rev Otolaringol. 1936;4:697-714.

Barbosa MV, A presença do Estado num trecho da história: luta pela terra no Pontal do Paranapanema [dissertação]. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 1990.



Belli A, Rodrigues B, Aviles H, Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of New World *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1998;58(1):102-9.

Berman JD. Human Leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin Infect Dis. 1997;24(4):684-703.

Böer A, Blödorn-Schlicht N, Wiebels D, Steinkraus V, Falk TM. Unusual histopathological features of cutaneous leishmaniasis identified by polymerase chain reaction specific for *Leishmania* on paraffin-embedded skin biopsies. Brit J of Dermatol. 2006;155:815-19.

Brandão-Filho SP, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil. Parasitol Today. 1994;10(19):329-30.

Brito AC. Aspectos histopatológicos da leishmaniose tegumentar americana. An Bras Derm. 1982; 57:145-6.

Brumpt E, Pedroso A. Pesquisas epidemiológicas sobre a leishmaniose americana das florestas no Estado de São Paulo. An Paul Med Cirur. 1913; 1:3-38.

Carine A, Paranhos U. Identificação das úlceras de Bauru ao Botão do Oriente. Rev Méd de São Paulo. 1909;12(6):111-6.

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(2):540-6.

Centro de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: [www.cve.saude.sp.gov.br/](http://www.cve.saude.sp.gov.br/). Acesso em: 13 de março de 2007.

Condino MLF, Sampaio SMP, Henriques LF, Galati EAB, Wanderlley DMV, Correa FMdeA. Leishmaniose Tegumentar Americana: flebotomíneos da área de transmissão no Município de Teodoro Sampaio, região Sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 1998;31(4):355-60.

Corte AA, Nozawa MR, Ferreira MdoC, Pignatti MG, Rangel O, Lacerra SS,. Aspectos eco-epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana no Município de Campinas. Cad Saúde Públ. 1996;12(4):465-72.

Cuba Cuba CA, Marsden PD, Barreto AC, Rocha R, Sampaio RR, Patzlaff L. Diagnóstico parasitológico e imunológico de leishmaniose tegumentar americana. Bol Ofic Sanit Panam. 1980; 89:195-208.

Çulha G, Akcali C, Detection of cutaneous leishmaniasis cases in Hatay and surrounding areas. *Turkiye Parazitoloj Derg.* 2006;30(4):268-71.

CVE.saúde.Sp.Gov.Br. 2007.

Da Cruz AM, Azeredo Coutinho KB. Leishmaniose tegumentar americana. In: Batista RS, Gomes AP, Igreja RP, Huggins RP, *Medicina Tropical, Abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias*. 1ª edição Ed Cultura Médica. 2001; I(15):131-40.

De Bruijn MH, Barker DC. Diagnosis of new World *Leishmaniasis*: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of Kinetoplast DNA. *Acta Trop.* 1992;52(1):45-58.

De Castro EA, Soccol VT, Membrive N, Luz E. Epidemiological and clinical study of 332 cases of cutaneous leishmaniasis in the north of Parana State from 1993 to 1998. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2002;35(5):445-52.

De Magalhães AV, Moraes MAP, Raick NA, Lannos-Cuentas A, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar por

Leishmania Braziliensis Brasiliensis. 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. Rev Inst Med Trop. 1986;28 (4) 253-62.

Dedet JP. Leishmania et leishmanioses du continent américain. Ann Inst Pasteur actualités. 1993;4(1): 3-25.

Deps PD. Estudo Comparativo entre o antimoniato de N. Metilglucamina e o Estibogluconato de Sódio BP88 no Tratamento da Leishmaniose Cutânea Localizada [dissertação]. Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo; 1998.

Dorval MEMC, Oshiro ET, Cupollilo E, de Castro ACC, Alves TP. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Rev Soc Meda Trop. 2006;39(1):43-6.

Escobar P, Matu S, Marques C, Croft SL. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH (edelfosine) and amphotericin B. Acta Trop. 2002;81(2):151-7.

Fernandes NC, Morgan I, Maceira JP. American Tegumentary Leishmaniasis; hospitalized cases in Rio de Janeiro. An Bras Dermatol. 2004; 79(4):431-9.

Floeter-Winter LM, Uliana SRB. Molecular biology applied to parasitology: The ribosomal cistron as a tool in taxonomic and phylogenetic studies and as model for gene expression analysis. *Mol Biol Brazil*. 1993;45:210-5.

Forattini OP, Rabello EX, Serra OP, Cotrim MdasD, Galati EAB, Barata IMS. Observações sobre a transmissão da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Públ*. 1976;10:31-43.

Furtado T. Critérios para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana. *An Bras Dermatol*. 1980;55(2):81-6.

Galati EAB, Nunes VLB; Cristaldo G; Da Rocha HC. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Patol Trop*. 2003;32 (2): 235-61.

Garcia FCB, Dos Santos SSR, Chociay MF, Medeiros ACR, Roselino AMF. Subsidiary methods for the diagnosis of American tegumentar leishmaniasis (ATL): comparison of sequencing of DNA and PCR-RFLP for identification of *leishmania* species in skin sample. *An Bras Dermatol*. 2005;80(3):339-44.

Garcia FCB. Métodos subsidiários para o diagnóstico da LTA: comparação dos resultados do seqüenciamento de DNA e da PCR-RFLP para determinação da espécie de *leishmania* em amostras cutâneo-mucosas (janeiro de 1993 a junho de 2004) [dissertação]. Ribeirão Preto,SP: Faculdade de Medicina, 2005.

Genaro O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Neves DP, Melo LA, Linardi PM. Parasitologia Humana 10ª ed. São Paulo. Ed Atheneu. 2000; 8: 36-53.

Gomes AC, Coutinho SG, Paim, GV, Oliveira SMO, Galati EAB, Nunes M P, Capinzaiki AN, Yamamoto YI, Rotter P. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 8 – Avaliação da atividade enzoótica de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em ambiente florestal e peridomciliar, no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1990;32 (2):105-15.

Gomes AC. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. An Bras Dermatol. 1992;67:55-60.

Gontijo B, De Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(1):71-80.

Grevelink AS, Lerner EA. Leishmaniasis. J Am Acad Dermatol. 1996;34(2):257-72.

Grimaldi G, Tesh RB, Macmahon-Pratt D. A review of geographic distribution and epidemiology of *leishmaniasis* in the new world. Am J Trop Med and Hyg. 1989;41(6):687-725.

Guerra JAdeO, Ribeiro JAS, Coelho LideARdaC, Barbosa MdasGV, Paes MG, 2006; Epidemiology of tegumentary leishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil. Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro, 22(11):2319-27.

Hepburn NC, Cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Dermatol. 2000;25:363-70.

Hirata MH, Hirata RDC. Aplicação da PCR em laboratório clínico e Medicina Forense [apostila]. In: Curso de Atualização. São Paulo: Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 1981.

Instituto de Terras do Estado de São Paulo – Itesp. Disponível em: [www.itesp.sp.gov.br/](http://www.itesp.sp.gov.br/). Acesso em 21 de fevereiro de 2007.

Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (Incra). Disponível em: [www.incra.gov.br/](http://www.incra.gov.br/). Acesso em 21 de fevereiro de 2007.

Kar K. Serodiagnosis of Leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol.* 1995;21(2):123-52.

Kerdel-Vegas F, Essensfeld-Yahr EE. Histopatologia de la leishmaniasis americana. *Med Cutan Iber Lat Am.* 1966;3: 267-276.

Klotz O, Lindenberg H. The pathology of Leishmaniasis of the nore. *Amer I Trop Med.* 1923; 3:117-41.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In W Peters, R Killick-Kendrick (eds), *The Leishmaniases in Biology and Medicine*, Academic Press, London. 1987;1:1-120.

Lainson R. *Leishmania* e Leishmaniose, com particular referência à Região Amazônica do Brasil. *Rev Paraense de Medicina.* 1997;11(1): 29-40.

Lainson R. The american leishmaniasis: some observation on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983;77(5):569-96.



Leite JF. A ocupação do Pontal do Paranapanema. São Paulo. [tese livre-docência]. São Paulo: Instituto de Planejamento e Estudos Ambientais da Universidade Estadual Paulista. UNESP; 1981.

Lindenberg A. A úlcera de Bauru e seu micróbio. Comunicação preventiva. Rev Med São Paulo. 1909; 12(6):116-20.

Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, Arevalo J. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. Am J Trop Med Hyg 1993;49(3):348-56.

Machado PE, Comparação dos métodos parasitológicos, imunológicos e molecular na detecção de Leishmaniose Tegumentar Americana no estado de Santa Catarina [dissertação]. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia; 2004.

Machado PRL, Araújo C, Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira JRA, Bittencourt A, Carvalho EM. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. Clin Infect Dis. 2002; 34(12): 69-73.

Madeira MMF, Uchoa CM, Leal CA, Macedo Silva RM, Duarte R, Magalhães CM, Barrientos Serra CM. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs. Rev Soc Bras Med Trop .2003;36(5):551-5.

Marquez FI. Leishmaniasis cutânea disseminada anérgica. Presentacion del primer caso observado em México. Med Cutan Iber Lat Am. 1966;3: 287-92.

Martins LM, Rebelo JMM, dos Santos MCFV, Costa JML, Da Silva AR, Ferreira LA, 2004; Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. Cad Saúde Pública. 2004;20(3):735-43.

Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. J Bras Med. 1992;63(5/6):82-104.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Sabroza PC, Souza WJS. Reação de imunofluorescência indireta e intradermoreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1980; 22(3):149-55.

Matta A. Sur le leishmanioses tegumentaires. Classification générale des leishmanioses. Bull Soc Pathol Exot Filiales. 1916;9: 493-503.

Medeiros ACR, Rodrigues SS, Roselino AMF. Comparison of the especificity of PCR and the histopatological detection of *leishmania* for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. Braz J Med Biol Res. 2002;35(4):421-24.

Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA. Histologic Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Clinics in Dermatology, 1999;17:297-304.

Mendonça SCF, Souza WJS, Nunes MP, Marzochi MCA, Coutinho SG. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988;83(3):347-55.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária (CENEPI). Situação da Prevenção e Controle das Doenças Transmissíveis no Brasil. 2002.

Ministério da Saúde. Guia de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Fundação Nacional de Saúde – CENEPI, 1994.

Montenegro J. Anatomico-patologia da Leishmaniose cutânea (úlceras de Bauru).

An Paul Med Cirurg. 1924;15: 5-11.

Muller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. Trends Parasitol, 2003; 19(7):320-8.

Name RQ, Borges KT, Nogueira LSC, Sampaio JHD, Tauil PL, Sampaio RNR.

Estudo clínico epidemiológico e terapêutico de 402 pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos no Hospital Universitário de Brasília, DF, Brasil. An Bras Dermatol. 2005;80(3):249-54.

NEVES DP. Parasitologia Humana. Ed. Atheneu, 10ª edição, 2000; 36-53.

Nunes AG, De Paula EV, Teodoro R, Prata A, Silva-Vergara ML. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose tegumentar americana em Vazlerlândia, Minas Gerais, Brasil. Cad Saúde Pública. 2006;22(6):1343-7.

Paiva BR, Passos LN, Falqueto A, Malafronte RdosS, de Andrade Jr. HF. Single step polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania* (*Viannia*) subgenus.; Rev Inst Med Trop. 2004;46(6):335-8.

Passos LN. Avaliação da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico da leishmaniose cutânea no Estado do Espírito Santo, Brasil [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2003.

Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Romanha AJ. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with american cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Tropica*. 1999;72(3):251-8.

Passos VMA. Leishmaniose Tegumentar Americana: Caracterização clínica, evolutiva, laboratorial e epidemiológica [tese]. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais; 1998.

Penela AS. Comparação entre os métodos da imunohistoquímica com anticorpo policlonal, imunohistoquímica com anticorpo monoclonal G2D10 e histopatologia pela hematoxilina-eosina no diagnóstico da Leishmaniose tegumentar americana na Amazônia. Pará.[dissertação]. Pará: Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará; 2001.

Pessôa SB, Barreto M P. Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Educação e Saúde, Rio de Janeiro; 1948.

Pessôa SB, Pestana, BR. Infecção natural do *Phlebotomus migonei* por formas em leptomonas, provavelmente de *Leishmania braziliensis*. Acta Médica, 1940, 5:106-11.

Peterson NE, Vexanet A, Rosa AC, Lago PRL. Isolation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from the rodent *Nectomys squamipes* captured in Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988;83 Suppl1:39.

Ramos e Silva M, Jacques CMC. Leishmaniasis and other Dermatozoonoses in Brazil. Clin Dermatol. 2002; 20(2):122-34.

Reed SG. Diagnosis of Leishmaniasis. Clin Dermatol. 1996;14(5):471-8.

Rodríguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. J Clin Microb. 1994;32(9):2246-52.

Salman SM, Rubeiz NG, Kibbi AG. Cutaneous Leishmaniasis: Clinical features and Diagnosis. Clin Dermatol. 1999;17(3):291-6.

Samady JA, Schwartz RA. Old word cutaneous leishmaniasis. Review. Int. J. Dermatol. 1997; 36:161-66.

Sampaio LFO. O aparecimento, a expansão e o fim da leishmaniose no Estado de São Paulo. Rev Bras Med.1951;8:717-21.

San Martin-Savani EM. Inquérito sorológico sobre leishmaniose tegumentar americana em cães errantes do Município de São Paulo, 1995-1996 [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 1998.

Santos IF. MST ocupa terras devolutas no Pontal do Paranapanema. Disponível em <http://carosamigos.terra.com.br/nova/novas.asp>. Acesso em 15 de dezembro de 2006.

Savani EM, Nunes VLB, Galati EAB, Castilho TM, De Araujo FS, Ilha IMN, Camargo MCGDEO, D'Auria SRN, Floeter-Winer LM. Occurrence of co-infection by *Leishmania (leishmania) chagasi* and *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(7):739-41.

Serra CMB, Leal CA, Figueiredo F, Schubach TM, Duarte R, Uchôa CMA, Silva RMM, Madeira MDEF. Canine Tegumentary leishmaniasis in Morada das Águias (Serra da Tiririca), Maricá. Rio de Janeiro, Brazil. Cad Saúde Pública. 2003;19(6):1877-80.

Shaw JJ, Lainson R. Ecology and Epidemiology: New Word. In Peters, W. & Killick-kendrick, R. (eds). The Leishmaniasis in Biology and Medicine, vol I. Academic Press. 1987;291-363.

Silva D. Leishmaniose anérgica hansenóide. An Bras Derm. 1978;53:161-8.

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(3):239-51.

Silveira FT. Patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana: caracterização clínica, histopatológica e imunológica da Leishmaniose cutânea disseminada, com ênfase na doença causada *Leishmania (Leishmania) amazonensis* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.

Silveira RC Frequência e distribuição da Leishmaniose em São Paulo [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1919.

Silveira TGV, Arraes SMAA, Bertolini DA, Teodoro U, Lonardoni MVC, Roberto ACBS, Ramos M, Sobrinho AN, Ishikawa E, Shaw JJ. Observations on laboratory diagnosis and cutaneous leishmaniasis epidemiology in the State of Paraná, South of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 1999; 32(4):413-23.



Simpson L. The mitochondrial genome of Kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. Annual Review in microbiology. 1987; 41:363-82.

Sotto MN, Yamashiro-kanashiro EH, Da Matta VL, De Brito T. Cutaneous leishmaniasis of the New World: diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. Acta Tropica. 1989;46(2):121-30.

Stolf HO, Marques SA, Marques MEA, Yoshida ELA, Dillon NL. Surto de Leishmaniose Tegumentar Americana em Itaporangá, São Paulo (Brasil). Rev Inst Méd Trop São Paulo. 1993;35(5):437-42.

Uliana SRB, 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. J Euk Microbiol. 1994;41(4):324-30.

Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Fé Filho NM, Queiroz RG, Santana EW, Bozza M, The identify of *Leishmania* isolated from sandflies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis, Baturité, Northeastern Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1994;50:158-64.

Velozo D, Cabral A, Ribeiro MCM, Motta JO, Costa IMC, Sampaio RNR. Leishmaniose mucosa fatal em criança. *Anais Bras Dermatol.* 2006;81(3):255-9.

Vianna G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (nota preliminar). *Bras. Méd.* 1911;25:411.

Walton BC, Brooks WH, Arjona I. Serodiagnosis of American leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. *Am J Trop Med Hyg.* 1972;21(3):296-9.

Weigle KA, De Davalos M, Heredia P, Molineros R, Saraiva NG, D'Alessandro A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;36(3):489-96.

Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *J Clin Microbiol.* 2002;40(2):601-6.

Who (World Health Organization. Leishmaniasis). Disponível em [www.who.int/leishmaniasis](http://www.who.int/leishmaniasis). acesso em 13 de fevereiro de 2007.

Zampieri RA, Savani ESMM, Castilho TM, Corbett CEP, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. A cheaper test for *Leishmania* identification adapted from SSU-based

methodology. In: XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. XXXII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease. 2005; Caxambu. v.1, p. 124.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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