



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE RONDÔNIA - UNIR  
NÚCLEO DE SAÚDE  
MESTRADO PROFISSIONAL EM ENSINO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE *LEISHMANIA* RNA VÍRUS - 1 (LRV-1) E  
AS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS CUTÂNEAS INICIAIS DA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA EM RONDÔNIA**

**CIPRIANO FERREIRA DA SILVA JÚNIOR**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PORTO VELHO - RONDÔNIA  
2014**

ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE *LEISHMANIA* RNA VÍRUS – 1 (LRV-1)  
E AS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS CUTÂNEAS INICIAIS DA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA EM RONDÔNIA.

CIPRIANO FERREIRA DA SILVA JÚNIOR

Dissertação apresentada ao programa de Mestrado Profissional em Ensino em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Rondônia - UNIR, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

ORIENTADOR: DR JUAN MIGUEL VILLALOBOS SALCEDO

PORTO VELHO - RONDÔNIA  
2014

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES**

S5861a

Silva Júnior, Cipriano Ferreira da

Associação entre a presença de leishmania RNA vírus – 1 (LRV-1) e as diferentes formas clínicas cutâneas iniciais da leishmaniose tegumentar americana em Rondônia / Cipriano Ferreira da Silva Júnior. Porto Velho, Rondônia, 2014.

78f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional em Ensino em Ciências da Saúde) Fundação Universidade Federal de Rondônia / UNIR.

Orientador: Prof. Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo

1. Leishmania 2. Leishmania RNA vírus 3. Prognosis 4. Cutaneous leishmaniasis. I. Salcedo, Juan Miguel Villalobos II. Título.

CDU: 616-071(811.1)

Bibliotecária Responsável: Ozelina Saldanha CRB11/947

## FOLHA DE APROVAÇÃO

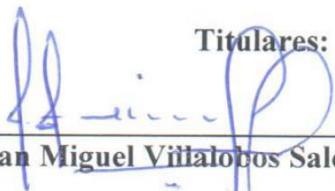
Cipriano Ferreira da Silva Júnior

### CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE *LEISHMANIA* RNA VÍRUS – 1 (LRV-1) E AS DIFERENTES FORMAS CLÍNICA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM RONDÔNIA

Dissertação apresentada ao curso de mestrado profissional em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Rondônia- UNIR, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em 25 de março de 2014.

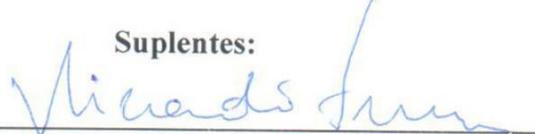
Titulares:

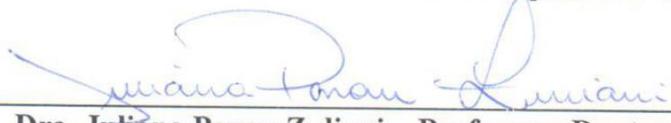
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo – Orientador - UNIR

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ana Lúcia Escobar – Professora Doutora - UNIR

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Mauro Shugiro Tada – Pesquisador - CEPEN

Suplentes:

  
\_\_\_\_\_  
Dr Ricardo de Godoi Mattos Ferreira – Pesquisador - FIOCRUZ-RO

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Juliãna Pavan Zuliani – Professora Doutora - UNIR

PORTO VELHO – RONDÔNIA

2014

## **INSTITUIÇÕES COLABORADORAS:**

1. Centro de Medicina Tropical de Rondônia – CEMETRON
2. Centro de Pesquisa em Medicina Tropical – CEPEM
3. Universidade Federal de Rondônia – UNIR
4. Fundação Osvaldo Cruz de Rondônia – FIOCRUZ-RO

A minha esposa Eugênia de Castro e Silva, que muito me ajudou na realização deste mestrado, cuidando carinhosamente de nossos maiores tesouros, Luíza e Laís, as princesas bonitinhas.

Ao meu falecido pai, exemplo de honestidade em sua vida e abnegação em cuidar de meu irmão mais velho deficiente Francisco de Assis Simeão Ferreira.

A minha mãe Maria de Jesus Simeão Ferreira, mulher forte e incentivadora dos nossos estudos, abdicando sempre em prol do desenvolvimento e sucesso dos filhos.

A minhas irmãs Adriana, Regina e Soraya, sempre preocupadas com o bem-estar familiar e interessadas em ajudar.

**“Eu acredito demais na sorte. E tenho constatado que, quanto mais duro eu trabalho,  
mais sorte eu tenho”**

**Thomas Jefferson**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre nos ilumina nos momentos de dificuldade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo, que me proporcionou esta oportunidade de crescimento científico.

Ao casal Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira e Lilian Motta Cantanhêde, que contribuíram de maneira fundamental com a realização dos exames em biologia molecular (PCR), além do suporte básico em informática na confecção de inúmeros itens aqui registrados.

Aos dedicados professores do Programa de Mestrado Profissional em Ensino em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Rondônia – UNIR, que abdicaram de suas atividades pessoais e familiares, contribuindo para que este Mestrado acontecesse.

Aos alunos do curso de Medicina da Universidade Federal de Rondônia- UNIR, sobretudo Leonardo de Souza Fernandes e sua turma, que me deram apoio logístico na reavaliação dos pacientes com LTA.

Aos pacientes que colaboraram com amostras teciduais e tempo pessoal, visando um bem maior, ou seja, o progresso da ciência.

À toda equipe técnico-administrativa do hospital CEMETRON, em especial o biomédico Claudino Limeira de Souza, que realizou as pesquisas diretas de *Leishmania*.

À minha tia Maria de Jesus Silva, professora mestre aposentada pela Universidade Federal do Piauí, que sempre estimulou a atividade acadêmica.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica mundial da Leishmaniose cutânea em 2009.....	17
Figura 2 - Distribuição espacial dos casos de LTA no Brasil: Média de casos do período de 2003 a 2005 e no ano de 2006 por município de residência. ....	18
Figura 3 - Taxonomia da <i>Leishmania</i> .....	20
Figura 4 - Ciclo de vida assexuado dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i> .....	22
Figura 5 - Formas promastigotas e amastigotas da <i>Leishmania</i> .....	23
Figura 6 - Patogenia da LTA causada por <i>L.(V.) braziliensis</i> e <i>L.(L.) amazonensis</i> na Amazônia brasileira.....	24
Figura 7 - Classificação da LTA no Brasil e seus respectivos agentes etiológicos.....	25
Figura 8 - Úlcera típica de LCL.....	26
Figura 9 - Cicatrizes atróficas da LCL .....	26
Figura 10 - Gel de Agarose par visualização dos resultados do PCR .....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais espécies de <i>Leishmania</i> dermatrópicas de comprometimento humano .	21
Tabela 2 - Esquema terapêutico preconizado para as diversas formas clínicas de LTA.....	32
Tabela 3 - Pacientes excluídos do estudo por não coletar a amostra para PCR .....	40
Tabela 4 - Distribuição dos casos em relação ao sexo .....	41
Tabela 5 - Distribuição de casos em relação a faixa etária.....	41
Tabela 6 - Distribuição dos casos quanto à procedência .....	42
Tabela 7 - Distribuição de casos conforme forma clínica de LTA.....	42
Tabela 8 - Distribuição dos casos conforme localização das lesões.....	43
Tabela 9 - Distribuição de casos conforme diâmetro das úlceras.....	43
Tabela 10 - Distribuição dos casos conforme adenomegalia .....	43
Tabela 11 - Percentual de positividade conforme método diagnóstico utilizado .....	44
Tabela 12 - Distribuição dos casos conforme a espécie de <i>Leishmania</i> .....	44
Tabela 13 - Distribuição dos casos por <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>Leishmania (V.) guyanensis</i> conforme número de úlceras.....	45
Tabela 14 - Distribuição do Número de Casos correlacionando o diâmetro da úlcera com as espécies <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (V.) guyanensis</i> .....	45
Tabela 15 - Característica clínicas e sócio demográficas associadas ao grupo de pacientes portadores de LTA infectados pelo LRV-1 e não infectados pelo LRV-1 .....	47
Tabela 16 - Análise univariada das variáveis estudadas para a presença do LRV-1.....	48
Tabela 17 - Regressão logística múltipla dos fatores de risco para a positividade do LRV-1	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

1. CEMETRON - Centro de Medicina Tropical de Rondônia
2. CEPEM - Centro de Pesquisa em Medicina Tropical
3. ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
4. FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
5. HE – Hematoxilina- Eosina
6. IFI – Imunofluorescência indireta
7. IL- Interleucina
8. IRM – Intradermorreação de Montenegro
9. LRV-1 – *Leishmania* RNA vírus-1
10. LC – Leishmaniose cutânea
11. LCAD – Leishmaniose cutânea anérgica difusa
12. LCDB – Leishmaniose cutânea disseminada borderline
13. LCL – Leishmaniose cutânea localizada
14. LCLU – Leishmaniose cutânea localizada úinca
15. LCLM – Leishmaniose cutânea localizada múltipla
16. LCM – Leishmaniose cutâneo-mucosa
17. LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
18. MS – Ministério da Saúde
19. OMS – Organização Mundial de Saúde
20. PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
21. SESAU – Secretaria de Saúde do Estado de Rondônia
22. SFM – Sistema Fagocítico Mononuclear
23. TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido
24. TLR 3- Receptores Toll like 3
25. TNF  $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa
26. UNIR - Universidade Federal de Rondônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1 BREVE HISTÓRICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR .....	14
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.3 AGENTE ETIOLÓGICO .....	20
1.4 CICLO DE VIDA PARASITÁRIO E PATOGENIA DA LTA.....	22
1.6 QUADRO CLÍNICO .....	24
1.7DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	29
1.8 TRATAMENTO .....	32
1.9 PROFILAXIA.....	32
1.10 <i>LEISHMANIA</i> RNA VÍRUS.....	33
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>34</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>36</b>
4.1 TIPO DE ESTUDO .....	36
4.2 LOCAL DO ESTUDO .....	36
4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO .....	36
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	37
4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	37
4.6 PROCEDIMENTOS DE COLETA.....	37
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	39
4.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	39

<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>
<b>APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	<b>72</b>
<b>APÊNDICE B: FORMULÁRIO PESQUISA SOBRE LEISMANIOSE TEGUMENTAR.....</b>	<b>75</b>
<b>APÊNDICE C: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO CENTRO DE PESQUISA EM MEDICINA TROPICAL DE RONDÔNIA - CEPEM.....</b>	<b>77</b>

## RESUMO

**Introdução:** A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) representa um importante e negligenciado problema de saúde pública mundial, tendo grande prevalência na Amazônia brasileira. Em até 10 % das vezes, pode evoluir para a forma cutâneo-mucosa (LCM). Prognosticar com segurança o potencial evolutivo da LTA para as formas polares mucosas tem sido uma difícil tarefa para inúmeros pesquisadores e médicos, não havendo consenso na literatura. O LRV-1 tem sido apontado com destacado papel no desencadeamento da LCM, amplificando a resposta inflamatória e subvertendo a capacidade de resolução da infecção pelos macrófagos do hospedeiro, favorecendo grave destruição tecidual. **Objetivos:** O objetivo do presente trabalho foi de descrever a presença do LRV-1 parasitando espécies de *Leishmania*, associando com as diferentes formas de apresentação clínica, tendo como referência características como número, localização, diâmetro da úlcera e presença ou ausência de adenomegalia. **Método:** As formas clínicas foram classificadas em cutânea pura, anérgica difusa, cutâneo-mucosa e mucosa. Todas as espécies de *Leishmania* e o LRV-1 foram identificados por biologia molecular (PCR). Tratou-se de uma pesquisa observacional, transversal e descritiva. **Resultados:** Foram analisados 33 pacientes com LTA, com idade média de 36 anos ( $\pm$  14,6 anos), consultados no hospital CEMETRON, localizado em Porto Velho-RO, diagnosticando 8 casos (24,2%) coinfectados com o LRV-1. As espécies coinfectadas pelo LRV-1 foram a *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) guyanensis*. No grupo de 8 coinfectados, destacaram-se: 8 pacientes (100%) do sexo masculino, 7 casos (87,5%) na faixa etária acima de 50 anos ou abaixo de 20 anos, múltiplas lesões em 5 casos (62,5%), localização acima da cintura pélvica em 5 casos (62,5%), diâmetro maior do que 2,5 cm em 6 casos (75%) e adenomegalia em 5 casos (62,5%). Na análise dos 33 pacientes, incluindo coinfectados e não coinfectados pelo LRV-1, a espécie mais frequente foi a *Leishmania (V.) braziliensis* com 24 casos (72,7%), seguida da *Leishmania (V.) guyanensis* com 8 casos (24,3%) e *Leishmania (V.) shawi* com 1 caso (3,0%). **Conclusão:** Na amostra estudada, observou-se um risco 25 vezes menor de coinfecção com o LRV-1 se a pessoa estiver na faixa etária entre 20 a 49 anos ( $p=0,01$ ). Descreve-se, nas amostras coinfectadas pelo LRV-1, uma tendência a lesões múltiplas, localizadas acima da cintura pélvica e com diâmetro acima de 2,5 cm.

**Palavras-chave:** *Leishmania*, *Leishmania* RNA vírus, Prognóstico, Leishmaniose cutânea localizada.

## ABSTRACT

**Introduction:** The American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is an important neglected public health problem worldwide, with high prevalence in the Brazilian Amazon. In 10% of patients, it can progress to mucocutaneous (MCL). To predict the factors related with the progress potential of LTA to mucous polar forms has been a difficult task for many researchers and physicians, and there is no consensus in the literature. The LRV-1 has been implicated as an important factor in triggering the LCM, amplifying the inflammatory response and subverting the ability to resolve the infection by the host macrophages, with severe tissue destruction. **Objective:** The objective of this study was to describe the presence of the LRV-1 in parasites of *Leishmania* species, associating with the different clinical forms, with reference to characteristics such as number, position, diameter of the ulcer and the presence or absence of adenomegaly. **Methods:** The clinical presentations were classified as pure cutaneous, diffuse anergic, mucocutaneous and mucous. All species of *Leishmania* and LRV-1 were identified by molecular biology (PCR). This was an observational, cross-sectional and descriptive study. **Results:** 33 patients were analyzed with ATL with a mean age of 36 years ( $\pm$  14.6 years) treated at CEMETRON hospital, located in Porto Velho, RO, diagnosing 8 cases (24.2%) co-infected with the LRV-1. The species co-infected by LRV-1 was *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (V.) guyanensis*. In the group of 8 co-infected stood out: 8 patients (100%) were male, 7 (87.5%) were older than 50 years old or younger than 20 years old, 5 (62.5%) had multiple lesions, 5 patients (62.5%) showed lesions located above the pelvic girdle, 6 (75%) had lesions greater than 2.5 cm and 5 (62.5%) presented adenomegaly. In the analysis of 33 patients, including co-infected and not co-infected by LRV-1, the most frequent species was *Leishmania (V.) braziliensis* in 24 cases (72.7%), followed by *Leishmania (V.) guyanensis* with 8 cases (24.3%) and *Leishmania (V.) shawi* responsible for 1 case (3.0%). **Conclusion:** In this sample, we observed a 25 fold lower risk of co-infection with the LRV-1 if the person is aged between 20-49 years ( $p = 0.01$ ). We described in samples co-infected by the LRV-1, a tendency to multiple lesions located above the pelvic girdle and having a diameter above 2.5 cm.

**Key Words:** *Leishmania*, *Leishmania* RNA virus, Prognosis, Cutaneous leishmaniasis.

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma antroponose crônica, infecciosa, não contagiosa, causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, tendendo a acometer pele, mucosa e /ou cartilagens.

A incidência mundial é estimada em torno de 1-1,5 milhões de casos novos por ano (SAMPAIO, 2008). Apresenta uma prevalência global de 12 milhões de infectados e há 350 milhões de pessoas com risco real de adquirir a LTA (VON STUBET, 2007). No Brasil, em 2003, o Ministério da Saúde registrou uma incidência de 33.000 casos/ano. Nota-se um progressivo aumento da ocorrência da LTA no Brasil e no mundo (BRASIL, 2006).

Apesar de ser considerada uma das cinco doenças infecto-parasitárias endêmicas de maior relevância mundial (GUERRA *et al*, 2007, WHO, 2010), constitui doença de notificação compulsória em apenas 30 países (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Representa uma das doenças negligenciadas pela indústria farmacêutica, segundo a lista da Organização Mundial de Saúde - OMS (CAMARGO; LANGONI, 2006). Tal fato resulta do pouco retorno financeiro de pesquisas voltadas a doenças de países em desenvolvimento que vivem em situação de pobreza.

Tem natureza multifatorial, destacando-se a espécie de *Leishmania*, resposta imune do hospedeiro, saliva do vetor, condições ambientais da região endêmica, presença ou ausência do *Leishmania* RNA vírus (LRV), dentre outros pouco esclarecidos.

Alexopolou *et al*. (2001) relaciona a presença do LRV com as formas mucosas, uma vez que o vírus estimula uma resposta hiper inflamatória, via receptores Toll like 3 (TLR-3). No entanto, não há trabalhos que correlacionem este vírus com as formas cutâneas iniciais da LTA, virgens de tratamento, levando-se em análise o número, diâmetro, localização das úlceras ou ocorrência simultânea de adenomegalia.

Portanto, em vista da dificuldade em se estabelecer a relação do LRV-1 com o padrão de apresentação da forma cutânea inicial, propôs-se este projeto.

### 1.1 BREVE HISTÓRICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Segundo Catorze (2005), os primeiros registros iconográficos conhecidos de leishmaniose cutânea pertencem à cerâmica pré-inca do Peru e Equador (400-900 d.C). Já no

Velho Mundo (Ásia, África e Europa), os relatos escritos da doença datam do século I d.C. Em 1571, Pedro Pizarro descreveu a desconfiguração de narizes e lábios de plantadores de coca que trabalhavam na base das encostas orientais das Cordilheiras dos Andes (PIZARRO, 1571 apud LAINSON, 2010). Nesta mesma região, inúmeras peças de cerâmica em estudos arqueológicos revelaram tais deformidades (LAINSON, 2010).

Atualmente, a leishmaniose mucocutânea é endêmica nestas regiões, sendo bastante provável que os artistas da época tentassem traduzir a LTA, uma vez que esta multilante doença causava grande sofrimento aos portadores crônicos.

A doença recebeu inúmeras denominações, incluindo uta, espúndia, “ulcer de los chileros”, buba, úlcera de Bauru, ferida brava, botão do oriente, porém o agente etiológico permaneceu desconhecido por muito tempo (VALE; FURTADO, 2005).

Alexandre Cerqueira em 1885, na Bahia, foi o primeiro a identificar a moléstia e a suspeitar do papel dos flebotomíneos como vetores (GONTIJO; CARVALHO, 2003). O agente causador do botão do oriente do Velho Mundo foi descoberto em 1903 (WRIGHT, 1903 apud LAINSON, 2010). Em 1906 foi denominado *Leishmania tropica* (LÜHE, 1906 apud LAINSON, 2010).

Lindenberg em 1909 identificou os “corpúsculos de *Leishman-Donovan*” que correspondiam às formas amastigotas em lesões cutâneas de pacientes com “úlcera de Bauru” no Brasil.

Em 1911, Vianna considerou que havia diferenças morfológicas entre a *Leishmania tropica* e o agente etiológico da Leishmaniose cutânea (LC), e a chamou de *Leishmania braziliensis* (VIANNA, 1911). Velez em 1913 denominou o parasita de *Leishmania peruvina*. Medina em 1946 descobriu no Brasil um parasita que causava lesões na pele do porquinho-da-índia doméstico. Este mesmo parasita seria depois denominado *Leishmania enriettii*.

Na Venezuela, Medina em 1962 denominou de *Leishmania pifanoi* o agente etiológico da leishmaniose cutânea difusa.

Em São Paulo, Forattini (1960) descreveu infecções em roedores, porém em nenhum dos casos foi comprovado que o organismo era idêntico ao que infectava seres humanos dentro daquela mesma localidade. A partir daquele momento, iniciou-se o questionamento da

probabilidade de diferentes espécies dermatrópicas de *Leishmania* serem agentes causadores da LTA em diferentes partes da região tropical. Pessôa em 1961 listou as espécies de *Leishmania* nas Américas como *L. (b.) braziliensis*, *L.(b.) guyanensis*, *L. (B.). peruviana*, *L.(B.) peruviana*, *L.(b.).pifanoi* e *L.(b.) mexicana*.

Maiores avanços no conhecimento da doença foram adquiridos em 1964 quando Lainson e Strangways-Dixon afirmaram que roedores selvagens eram reservatórios da doença. Lainson e Shaw (1969) notaram diferenças no comportamento biológico de espécies de *Leishmania*, classificando-as como “cepas rápidas e lentas” de *Leishmania*.

Evolutivamente, estudos foram realizados comparando as cepas e as respectivas formas clínicas de LTA, notando o caráter dinâmico e espectral da doença.

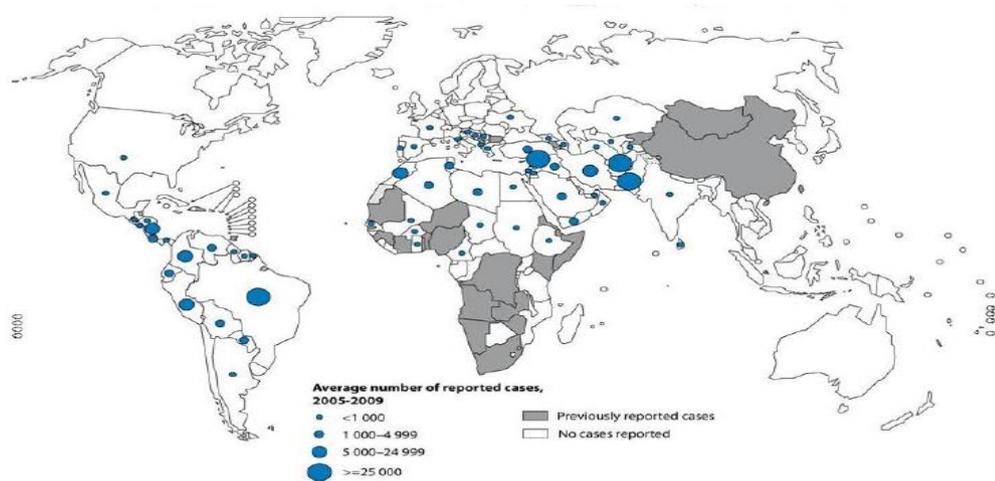
O antimonial trivalente, tártaro emético, foi introduzido no Brasil por Gaspar Vianna em 1912 (VIANNA, 1912). A terminologia leishmaniose tegumentar americana (LTA) foi introduzida por Rabello em 1923. Montenegro em 1926 utilizou a intradermoreação no diagnóstico imunológico da LTA.

Aragão (1927) demonstrou o papel da *Lutzomyia intermédia* na transmissão de *Leishmania braziliensis*. Em 1978, Lainson e Shaw classificaram as *Leishmanias*, adotando os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (SAF'IANOVA, 1982).

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

Conforme registros da Organização Mundial de saúde (2010) a LTA é uma doença que está distribuída em diversas regiões do planeta, podendo-se observar a distribuição geográfica mundial na figura 1.

**Figura 1 - Distribuição geográfica mundial da Leishmaniose cutânea em 2009**

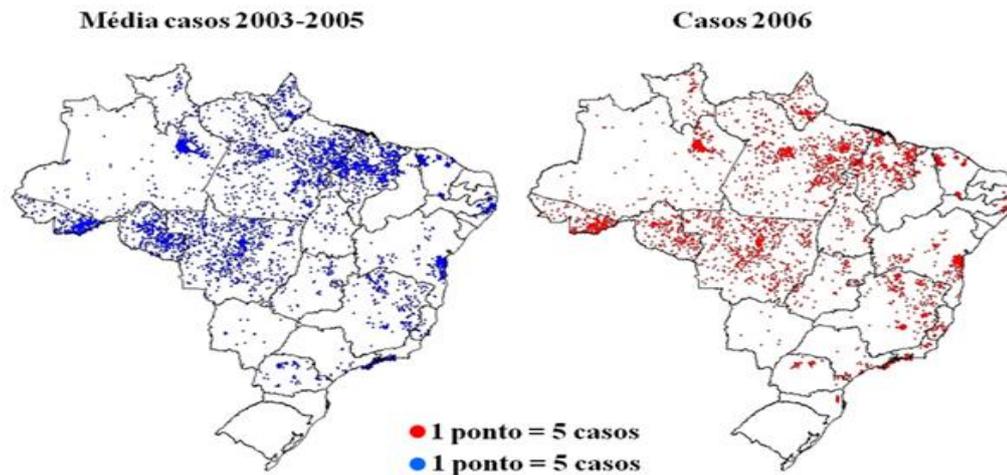


**Fonte: World Health Organization, 2009.**

Tem sido descrita em quase toda a América, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Uruguai e do Chile. 90% dos casos de LTA mucosa ocorrem no Brasil, Bolívia e Peru de acordo com relatos de LAINSON (1983). Silva *et al.*, (2007) estimam a ocorrência de 65.000 casos novos por ano no Brasil, tendo o território brasileiro a maior prevalência da doença em todo o continente Americano.

No Brasil, todos os estados registraram autoctonia, estando 45% dos casos registrados na região Norte, destacando-se alguns estados com maior concentração de casos (BRASIL, 2007), conforme demonstrado na figura 2.

**Figura 2 – Distribuição espacial dos casos de LTA no Brasil: Média de casos do período de 2003 a 2005 e no ano de 2006 por município de residência**



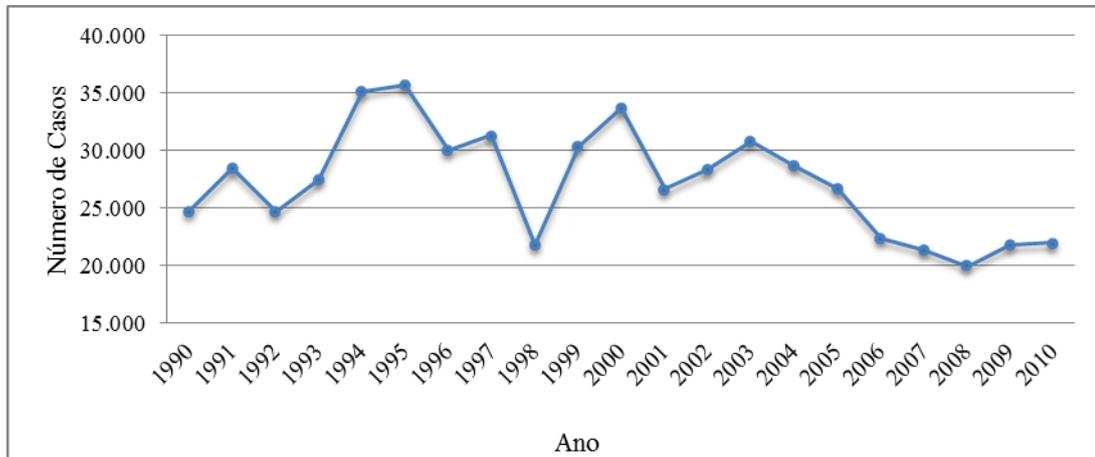
**Fonte:** MS/SVS/Devep/CGDT/Covev/Fiocruz/Ensp/Desp

Em nosso país, a grande maioria dos casos predomina na região Amazônica.

A incidência tem aumentado em áreas não endêmicas, por aumento da coinfeção com HIV, transplante de órgãos, moderna imunossupressão, intercâmbio de pessoas e urbanização.

Segundo Machado (2009), a incidência da LTA cutânea aumentou duas vezes no Brasil entre 1998 e 2002; 4 vezes no Afeganistão entre 1994 e 2002 e quase 85 vezes em Burkina Faso.

Foi observado um aumento significativo do número de casos de LTA a partir de 1990, onde o número de casos permaneceu instável durante anos. A partir do ano de 2000, esse número vêm diminuindo, conforme demonstrado no gráfico 1.

**Gráfico 1 - Casos de leishmaniose tegumentar no Brasil no período de 1990 a 2010**

Fonte: SVS/MS

Em 2009, o estado de Rondônia registrou 1035 casos de LTA, de acordo com as informações colhidas no Sistema Nacional de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011).

Basano (2004) apontou um longo período de evolução da lesão leishmaniótica, que durava em torno de 15 meses, desde a sua forma inicial até o seu diagnóstico. Tal fato, em parte, decorre da falta de capacitação técnica dos profissionais de saúde.

A real prevalência da LTA é difícil de ser estabelecida, em vista das subnotificações, diagnósticos incorretos, variações de resposta do hospedeiro e multiplicidade de agentes etiológicos envolvidos (MARZOCHI, 1992).

Segundo Ramirez (1997), Dr. Néstor Añez, pesquisador venezuelano, defende em relato pessoal que a positividade imunológica humoral (Anticorpos circulantes) e celular (Reação de Montenegro) é de 12% em habitantes assintomáticos (Sem lesões ativas ou cicatrizes) de região endêmica da Venezuela.

No Brasil, quatro padrões epidemiológicos podem ser observados (MARZOCHI; MARZOCHI, 1997):

1. Silvestre florestal – Zoonose de animais silvestres;
2. Periflorestal – Áreas de ocupação que rodeiam florestas, situadas no raio de vôo dos vetores silvestres;

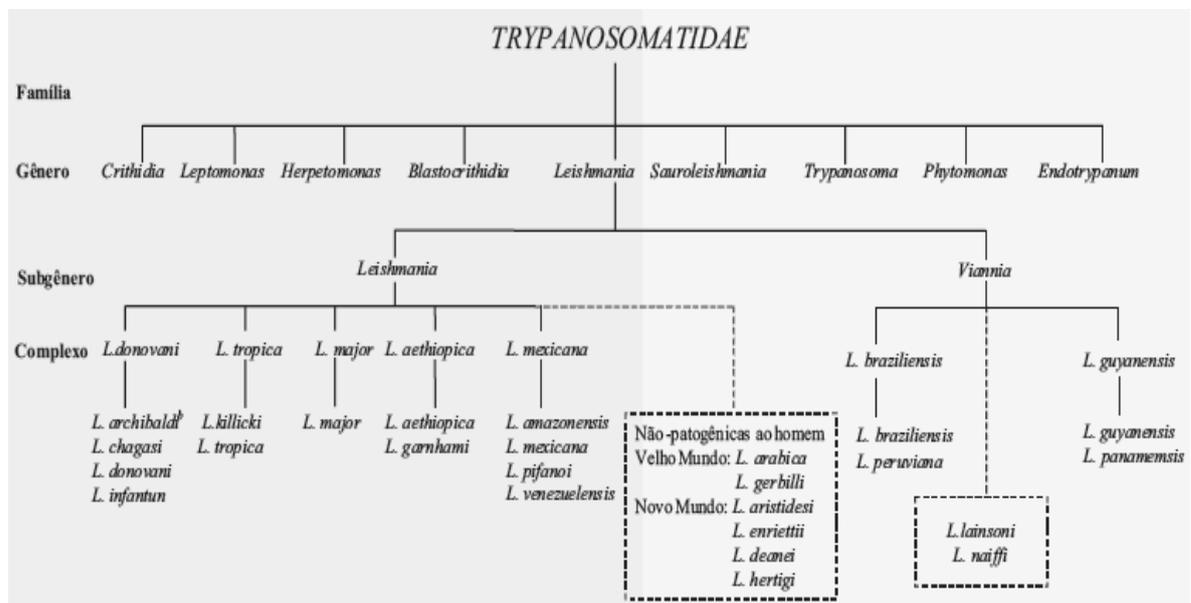
3. Rural – Áreas de colonização antiga, constituindo uma zoonose de matas residuais;
4. Periurbana – Áreas de colonização antiga, onde houve adaptação do vetor ao peridomicílio.

O estado de Rondônia agrega os quatro padrões epidemiológicos descritos na literatura. Hoje predominam as formas silvestres florestais e periflorestal, representada por pescadores, caçadores, militares em atividade de treinamento, aventureiros em atividade de laser, ecoturismo, agricultores que residem e trabalham em áreas que rodeiam florestas.

### 1.3 AGENTE ETIOLÓGICO:

Conforme citação de Batista *et al.*, em 2001, a classificação taxonômica dos agentes etiológicos da LTA inclui o filo: *Protozoa*, subfilo: *Sarcomastigophora*, classe: *Mastigophora*, ordem: *Kinetoplastida*, família: *Trypanosomatidae* e gênero: *Leishmania*, conforme detalhado na figura 3.

**Figura 3 - Taxonomia da *Leishmania***



Fonte: SVS - Manual de leishmaniose Tegumentar Americana, 2006.

Ameen (2010) defende que há mais de 20 diferentes espécies de *leishmania*. A Secretaria de Vigilância em Saúde registra que há nas Américas onze espécies dermatrópicas de *leishmania* causadoras da doença humana e oito espécies descritas em animais. No Brasil

já foram identificadas 7 espécies, sendo seis pertencentes ao subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* conforme mostrado na tabela 1 (BRASIL, 2007).

Tabela 1 - Principais espécies de *Leishmania* dermatrópicas com comprometimento humano

<b>Subgênero Vianna (Lainson e Shaw, 1972)</b>	<b>Acometimento Clínico no Homem</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> (Vianna, 1911)	Lesões cutâneas e mucosas	Da América Central ao Norte da Argentina
<i>Leishmania (V.) peruviana</i> (Velez, 1913)	Predominantemente lesões cutâneas	Vales elevados Interandinos e encosta oeste dos Andes
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i> (Floch, 1954)	Predominantemente lesões cutâneas	Calha Norte da Bacia Amazônica, Guianas e países do noroeste sul americano
<i>Leishmania (V.) panamensis</i> (Lainson e Shaw, 1972)	Predominantemente lesões cutâneas	América Central e costa pacífica da América do Sul
<i>Leishmania (V.) lainsoni</i> (Silveira <i>et al.</i> , 1987)	Rara ocorrência, provocando lesões cutâneas	Norte do estado do Pará
<i>Leishmania (V.) naiffi</i> (Lainson <i>et al.</i> , 1990)	Rara ocorrência, provocando lesões cutâneas	Região Amazônica
<i>Leishmania (V.) shawi</i> (Shaw <i>et al.</i> , (1991)	Rara ocorrência, provocando lesões cutâneas	Região Amazônica
<b>Subgênero Leishmania (Saf lanova, 1982)</b>	<b>Acometimento Clínico no homem</b>	<b>Distribuição Geográfica</b>
<i>Leishmania (L.) mexicana</i> (Blagi, 1953)	Lesões cutâneas e eventualmente, cutâneo-difusas	México e América Central
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i> (Lainson e Shaw, 1972)	Lesões cutâneas e eventualmente, cutâneo-difusas	América Central e regiões Norte, Nordeste, Centro Oeste e Sudeste do Brasil
<i>Leishmania (L.) venezuelensis</i> (Bonfante-Garrido, 1980)	Lesões cutâneas	Venezuela
<i>Leishmania (L.) pifanoi</i> (Medina e Romero, (1959)	Lesões cutâneas e eventualmente, cutâneo-difusas	Venezuela

Fonte: Mazorchi, Schubach & Mazorchi, 2006.

No entanto, existem algumas outras espécies de *Leishmania* ainda não identificadas. O aumento da acessibilidade a técnicas laboratoriais, assim como o conhecimento da biologia molecular do protozoário proporcionará a identificação precisa destas amostras.

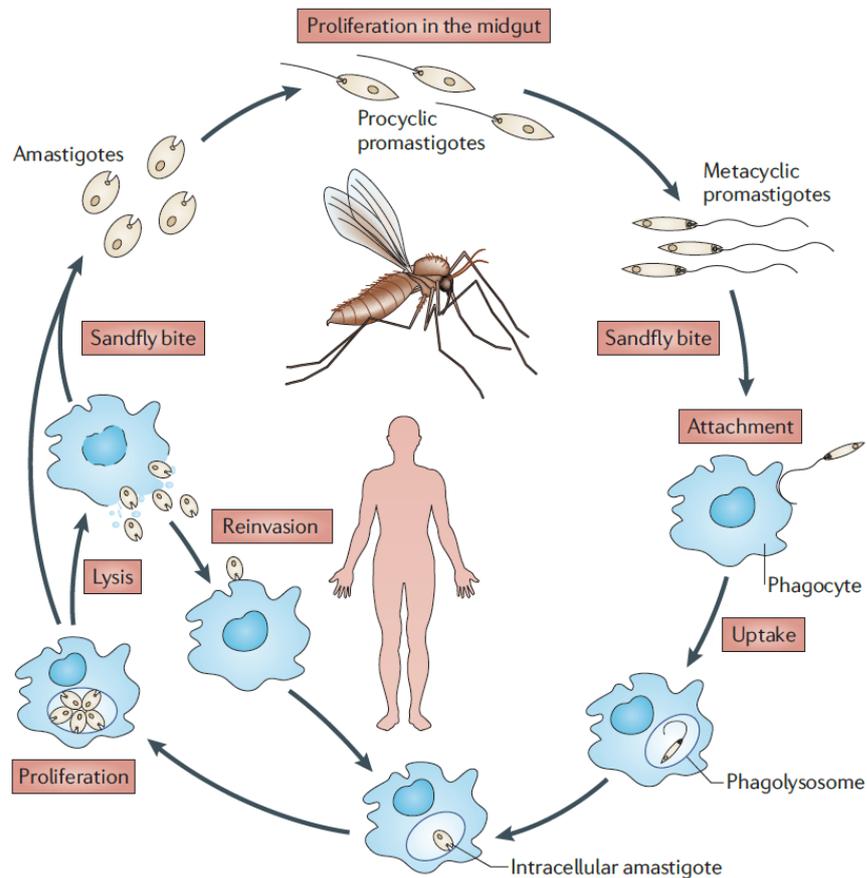
Segundo o Ministério da Saúde em 2010, no Brasil a leishmaniose tegumentar é causada principalmente pelas espécies:

- *Leishmania Viannia braziliensis* (Pele e mucosas);
- *Leishmania Viannia guyanensis* (Predomina pele, porém acomete mucosas);
- *Leishmania Leishmania amazonensis* (Pele e eventualmente lesões cutâneas difusas)

#### 1.4 CICLO DE VIDA PARASITÁRIO E PATOGENIA DA LTA:

Após o repasto sanguíneo no reservatório, o flebótomo adquire as formas amastigotas. A amastigota é a forma intracelular obrigatória dos vertebrados, imóvel, ovalada ou arredondada (HOARE; WALLACE, 1966). No interior do tubo digestivo do inseto, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas infectantes. A infecção humana tem seu início logo após a inoculação das formas promastigotas do parasito na pele, o que acontece durante a hematofagia pelas espécies de flebótomos vetores (SILVEIRA *et al.*, 2004) demonstrado no esquema da figura 4.

**Figura 4 - Ciclo de vida assexuado dos parasitos do gênero *Leishmania***



Fonte: KAYE SCOTT, 2011.

Walters (1993) destaca os vetores flebotomíneos que pertencem aos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo.

Na figura 5, as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* podem ser observadas.

**Figura 5 - Formas promastigotas e amastigotas da *Leishmania***



**Fonte: GONTIJO; CARVALHO, 2003**

Silveira *et al.*, (2008) reforça que uma vez no hospedeiro vertebrado, a *Leishmania* iniciará um processo de escape frente as defesas do organismo parasitado, precisando sobreviver ao processo de fagocitose. A partir do escape inicial à ação lítica do complemento, assim como aos mecanismos de defesa intracelular, a evolução clínica da LTA dependerá da virulência da espécie de *Leishmania* e do perfil imunogenético do hospedeiro.

Silveira *et al.*, (2008) em sua revisão sobre a patogenia da LTA na Amazônia, defende que há uma complexa interação entre as múltiplas espécies de *Leishmania* e a resposta imune do homem infectado, ressaltando que as duas espécies de maior potencial patogênico são a *L.(V.) braziliensis* e a *L.(L.) amazonensis*, havendo uma dicotomia entre estas duas espécies e a resposta imune celular. Estas duas espécies podem causar a forma mais simples da doença leishmaniose cutânea localizada (LCL), assim como os extremos polares: leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) e leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD), respectivamente. A *L.(V.) braziliensis* ativa o perfil de resposta CD4 tipo Th-1, ao passo que a *L.(L.) amazonensis* ativa o perfil de resposta CD4 tipo Th-2. Na resposta CD 4 tipo Th-1, há a produção de citocinas Interleucina 2 (IL-2), Interferon  $\gamma$  ( $\gamma$ - IFN) e Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ). Na resposta CD 4 tipo Th-2, há a produção de Interleucinas (IL) 4, 5, 6, 10 e 13. A resposta tipo Th-1 regula positivamente e a Th-2 regula negativamente a atividade do macrófago na eliminação do parasita. Este autor resume a patogenia conforme a figura 6.

**Figura 6 - Patogenia da LTA causada por *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis* na Amazônia brasileira.**

Espectro clínico, histopatológico e imunopatológico					
Formas clínicas	LCAD	LCDB	LCL	LCDB	LCM
Parasito	<i>L. (L.) a.</i>	<i>L. (L.) a.</i>	<i>L. (L.) a. / L.(V.) b.</i>	<i>L. (V.) b.</i>	<i>L. (V.) b.</i>
Carga parasitária	++++	+++	+++ / ++	+	-
Tipo de lesão	nódulo	placa infiltrada	úlceras/úlceras	pápula ulcerada	necrótica
Distribuição	difusa	disseminada	única/múltipla	disseminada	naso-bucal
Macrófago	++++	+++	+++ / ++	+	-
Plasmócito	+	++	+++ / +++	+++	+++
Linfócito	+	++	+++ / +++	+++	++++
Necrose	-	-	+ / ++	++	++++
Granuloma	-	epitelióide	epitelióide/epitelióide	epitelióide	tuberculóide
DTH	-	-	± / ++	±	++++
Linfoproliferação	-	-	± / ++	±	++++
IFN- $\gamma$	+	+	+++ / +++	++	++++
IL-4	++++	++	+ / -	+	-
Células T CD4	Th2	Th1 $\geq$ Th2	Th1/Th1	Th1 > Th2	Th1
Tratamento (Sbv)	±	++	++++ / ++++	+++	++

LCAD = leishmaniose cutânea anérgica difusa; LCDB = leishmaniose cutânea disseminada borderline; LCL = leishmaniose cutânea localizada; LCM = leishmaniose cutâneo-mucosa; *L. (L.) a.* = *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; *L. (V.) b.* = *Leishmania (Viannia) braziliensis*; DTH = hipersensibilidade do tipo retardada; IFN-g = interferon gamma; IL-4 = interleucina 4; Th1 = linfócito T auxiliador 1; Th2 = linfócito T auxiliador 2; Tratamento (Sbv) = terapêutica com antimônio pentavalente

Fonte: SILVEIRA *et al.* Revisão sobre a patogenia da LTA na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*, 2008.

Além disso, as duas espécies podem ser agentes causais das formas intermediárias disseminadas, denominada leishmaniose cutânea disseminada borderline (LCDB), situadas entre os extremos polares. A espécie *L. (V.) guyanensis* pode causar as formas LCL, LCDB e LCM. Já as outras espécies dermatrópicas da Amazônia brasileira, *L. shawi*, *L. naiffi*, *L. lainsoni* e *L. lindenbergi* são agentes causais somente da forma LCL (SILVEIRA, 2008).

No estado de Rondônia, temos observados casos de LCM causados por *L.(V.) guyanensis* e Guerra *et al.*, (2011a) descreveu casos de LCM associados a *L.(V.) guyanensis* na Região Norte.

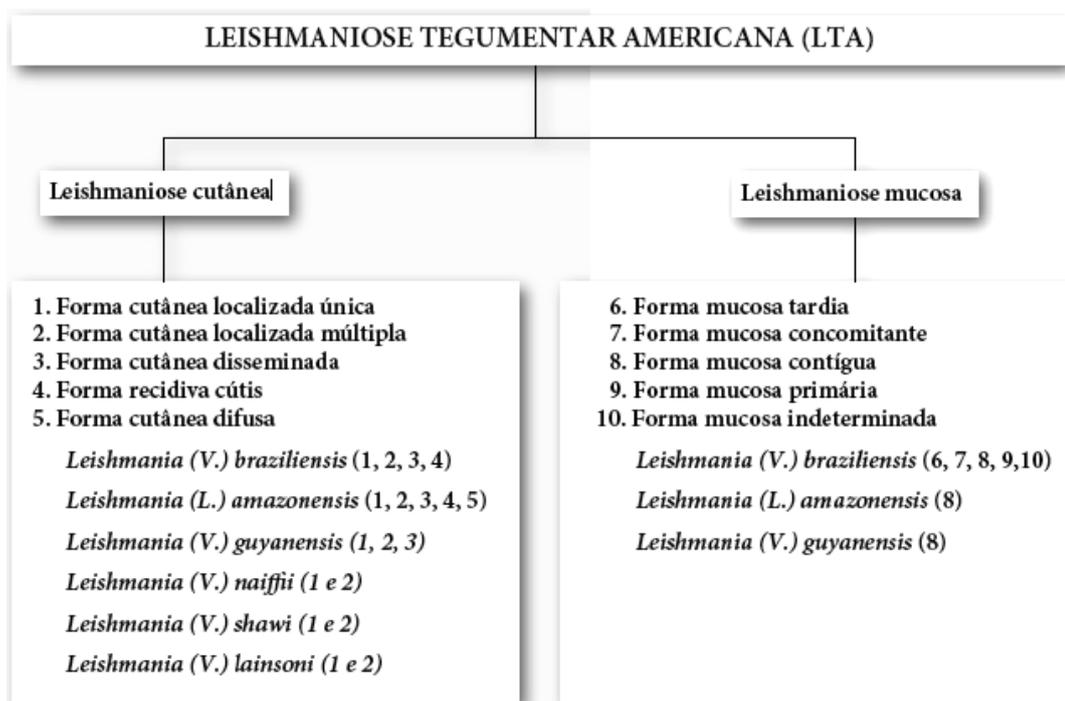
## 1.6 QUADRO CLÍNICO

Há grande variação entre as diversas formas clínicas, que vão desde as formas inaparentes e autolimitadas até lesões disseminadas e difusas, atingindo pele, mucosas e cartilagens, compondo uma manifestação espectral. Quadros assintomáticos ocorrem em pacientes naturalmente resistentes, capazes de controlar a progressão da infecção. Via de

regra, tem início pela forma cutânea localizada (LCL), forma mais comum que corresponde a 95% dos casos, podendo evoluir ou não para as formas cutâneas disseminadas borderline (LCDB), cutâneo-mucosa (LCM) ou anérgica difusa (LCAD), porém falta domínio em relação aos fatores clínicos e laboratoriais que influenciam a evolução da doença.

Do ponto de vista clínico, LCM e LCAD são consideradas formas polares da doença, representando extremos evolutivos da infecção inicial. No pólo anérgico, encontra-se a forma cutânea anérgica difusa (LCAD) e no pólo hiperérgico, a forma mucosa (LCM) (SILVEIRA, 2008). O Ministério da Saúde do Brasil (2006) adota a classificação da LTA demonstrada na figura 7.

**Figura 7 - Classificação da LTA no Brasil e seus respectivos agentes etiológicos.**



Fonte: SVS - Manual de Leishmaniose Tegumentar Americana, 2006

Turetz *et al.*, (2002) dividem a LCL em forma única (somente uma lesão) e múltipla (número menor do que 10 em qualquer distribuição corporal ou maior do que 9 localizadas em um mesmo segmento corporal). LCDB corresponde a ocorrência de lesões pleomórficas múltiplas (papulares, acneiformes e ulceradas) em número maior do que 10, distribuídas em duas ou mais áreas não contíguas do corpo (cabeça, tronco, braços e pernas), que se instalam em um período de dias.

Em Rondônia, a localização mais comum da LCL é nos membros inferiores.

A úlcera cutânea clássica apresenta bordas emolduradas e fundo granuloso, limpo ou recoberto por crostas séricas, melicéricas e/ou hemáticas, conforme ilustra a figura 8.

**Figura 8 - Úlcera típica de LCL**



Fonte: acervo pessoal Cipriano Ferreira

Após a cicatrização, a lesão apresenta-se atrófica de aspecto apergaminhado, demonstrado na figura 9.

**Figura 9 - Cicatrizes atróficas da LCL**



Fonte: acervo pessoal Cipriano Ferreira

Segundo Silveira *et al.*, (2008), a LCL corresponde a 95% de todos os casos, tendo como agente principal a *L.(V.) braziliensis*. Somente infecções por espécies do subgênero

*Viannia* evoluem para o pólo hiperérgico da LCM, ao passo que infecções causadas pelo subgênero *Leishmania* tendem a evoluir para o pólo de hiporreatividade da LCAD.

Machado *et al.*, (2002) defende que em 85% das formas cutâneas causadas por *L. (V.) braziliensis*, a úlcera é acompanhada por exuberante adenomegalia regional maior do que 3 cm.

Em camundongos resistentes à doença, a excisão da cadeia linfática homolateral ao sítio da infecção induz ao rápido aparecimento de lesões metastáticas (REED *et al.*, 1986 apud GUIMARÃES *et al.*, 2005). Neste estudo, os camundongos estavam infectados pela espécie *Leishmania (L.) amazonensis*.

Deste modo, a adenomegalia regional parece conferir algum grau de imunidade à *leishmania*, aliada a certo grau de destruição tecidual induzida pela resposta imune, porém estudos adicionais precisam ser realizados.

Nas infecções por *L.(V.) braziliensis* a linfadenopatia regional geralmente precede o surgimento das ulcerações por uma a doze semanas (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Segundo Guimarães *et al.*, (2005), na Bahia, a quase totalidade de casos de LCDB é causada pela *L.(V.) braziliensis*. Calafrios e astenia podem estar presentes na fase inicial de instalação, sugerindo disseminação hematogênica da doença.

Silveira *et al.*, (2008) defende que nas formas LCDB, a imunidade encontra-se parcialmente inibida. Este grupo pode ser causado por *L.(V.) braziliensis* ou por *L.(L.) amazonensis*, diferenciando pela rápida instalação ( até 3 meses) de dezenas a centenas de lesões cutâneas pápulo-ulcerosas (ectimatóides) no primeiro agente, ao passo que no segundo, as lesões ocorrem de maneira mais lenta , em número limitado (< 10) e não ulceram. A *L.(V.) braziliensis* tende a cursar com reação de Montenegro positiva e a *L.(L.) amazonensis* com Montenegro negativa. A *L (V.) braziliensis* metastatiza precoce e tardiamente para diferentes partes do corpo, sobretudo mucosa nasofaríngea.

Turetz *et al.*, (2002), na Bahia, estudaram retrospectivamente 2206 casos de LTA, detectando 42 (1,9%) pacientes com LCDB e 2164 (98,1%) com LCL, dos quais 1483 (69%) cursaram com uma única lesão e 681 (31%) com mais de uma lesão. Lesões acima da cintura pélvica estavam presentes em 100% da forma LCDB e em apenas 40% da LCL.

Acometimento mucoso concomitante se deu em 29% da LCDB comparado a 1,2% da LCL. As úlceras apresentaram maior diâmetro na LCDB. LCDB com acometimento mucoso desenvolveu acometimento cutâneo facial ou cervical em 100% dos casos, comparados aos 44% de LCL com acometimento mucoso. Os autores relatam que pacientes portadores da LCDB, produzem menos interferon- $\gamma$  e fator de necrose tumoral- $\alpha$  do que os casos de LCL. Do ponto de vista imunológico, a LCDB aproxima-se da LCAD, em especial as formas relacionadas a *L.(L.) amazonensis*. Uma limitação importante desta pesquisa esta relacionada à não identificação das espécies de *Leishmania*, comprometendo assim a correlação entre os achados clínicos e os respectivos agentes etiológicos.

Conforme Puig *et al.*, (2003), poderá ocorrer acometimento visceral em casos de imunossupressão grave, em especial infecção pelo HIV. Tal fato decorre do fenômeno da persistência na LTA, traduzida por cura clínica, porém não-estéril em 93,7% das vezes (MENDONÇA *et al.*, 2004).

Jones *et al.*, (1987) relatam que a LCM clássica se dá em aproximadamente em 2,7% dos pacientes com LC, instalando-se em meses ou anos após a cura das lesões cutâneas. Em média, 6 anos após a lesão cutânea. Acredita-se que as formas mucosas não tratadas sejam progressivas, não havendo cura espontânea.

Basano (2004) relata que a evolução para LCM é de 2% em casos tratados de LC e de 10% em casos não tratados com N metil glucamina.

Marsden (1986) estabeleceu critérios de risco evolutivo para as formas mucosas:

- Lesões múltiplas
- Lesões extensas
- Localização acima da cintura pélvica
- Tratamento inadequado da lesão cutânea primária

Devemos considerar que estados de imunossupressão, mesmo anos após a cura da LCL, podem favorecer esta complicação.

A LCM caracteriza-se por obstrução nasal, coriza com odor desagradável, acometendo o nariz na quase totalidade dos casos. Nesta região, destaca-se o acometimento do septo nasal

cartilaginosa, porém a parede lateral e assoalho nasal podem ser envolvidos. Quanto maior o tempo de evolução, mais grave se torna o acometimento, podendo resultar em destruição completa do aparelho nasal. A extensão da doença pode evoluir para faringe, laringe e cordas vocais.

O Ministério da Saúde do Brasil relata que nas formas mucosas, predomina a *Leishmania (V.) braziliensis*, e excepcionalmente, a *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) guyanensis* (BRASIL, 2006). No Velho Mundo, Strazzulla *et al.*, (2013) associam a LCM com *Leishmanias* dos complexos *L. donovani* e *L. major*.

A forma anérgica difusa é rara. É causada pela *L.(L.) amazonensis*, caracterizando-se por baixa resposta imunológica por parte do hospedeiro, riqueza parasitária nas lesões cutâneas e cursa com infiltração difusa da pele com inúmeras lesões nodulares não-ulceradas. O fenômeno da ulceração parece ser secundário a traumas locais e não sendo mediado pelo sistema imunológico.

Silveira (2009) aponta para a maior ocorrência da LCAD em crianças menores do que 5 anos, que se tornam doentes crônicos, equivalendo a 60% dos casos. Em casos avançados, pode complicar com osteomielite e comprometimento da mucosa nasobucofaringea, poupando apenas couro cabeludo e regiões palmo-plantares. Em 2009, havia menos do que 20 casos no Brasil, destacando-se o estado do Pará.

## 1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Baseia-se em métodos parasitológicos, histológicos, imunológicos e moleculares, confirmando a suspeita clínica e epidemiológica (BRASIL, 2010):

### a) Exames parasitológicos

#### a. 1 Pesquisa de amastigotas em esfregaço da lesão ou imprint de fragmento de tecido:

A confirmação da presença de amastigotas é essencial no diagnóstico, uma vez que afasta de maneira precisa outros diagnósticos diferenciais. O material a ser pesquisado pode resultar de escarificação, biópsia com impressão por aposição do tecido em lâmina ou por punção aspirativa. Nas lesões ulceradas, o melhor local de coleta é na borda da úlcera. Os

parasitas quando presentes são encontrados em vacúolos intracitoplasmáticos dos macrófagos ou nos espaços intercelulares. Utilizam-se os corantes Giemsa ou Leishman.

Furtado (1980) afirma que a sensibilidade da pesquisa de *leishmania* é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão. Nos casos produzidos por *Leishmania (V.) braziliensis*, a sensibilidade é de 100% nos dois primeiros meses, em torno de 75% aos seis meses e de 20% acima de doze meses.

a. 2 Cultura em meios artificiais:

BRASIL (2010) preconiza o isolamento do parasita por meio de cultura. Este método permite a confirmação do diagnóstico e a identificação da espécie envolvida. O material obtido por meio de escarificação, punção ou biópsia da lesão tecidual deve ser inoculado em meio de cultura Agar-sangue de Novy e Macneal modificado por Nicole (NNN). A temperatura deve ser mantida entre 24 a 26° C, permitindo um bom crescimento em torno de 5 dias. Um resultado negativo somente deve ser liberado após 30 dias de cultivo. Encontra-se a forma promastigota. Segundo Montenegro (1926), a sensibilidade deste método é em torno de 50% para *Leishmania (V.) braziliensis*.

a.3 Inoculação em animais experimentais (Hamsters)

Método não utilizado comercialmente, porém é baseado na inoculação do material coletado das lesões das patas posteriores ou focinho do hamster *Mesocricetus auratus*.

b) Exames imunológicos

b.1 Intradermorreação de Montenegro (IDRM):

É uma reação de hipersensibilidade tardia de alta sensibilidade e especificidade para LTA e representa importante exame complementar no diagnóstico em regiões endêmicas. Segundo Furtado (1980) a sensibilidade oscila entre 86 e 100% e a especificidade de aproximadamente 100%, porém há controvérsias na literatura quando se discute sensibilidade e especificidade desta técnica. Shaw *et al.*, (1975) defende a possibilidade de reação cruzada em casos de Doença de Chagas e em indivíduos curados de leishmaniose visceral. Pode ser negativo em lesões recentes, na forma cutânea anérgica difusa e em pacientes imunossuprimidos.

A técnica do teste é baseada na injeção intradérmica de 0,1 ml do antígeno solúvel de promastigotas mortas de *Leishmania amazonensis* (MELO *et al.*, 1977) a 3cm da dobra cubital do antebraço seguida da realização de leitura após 48 horas. Induração acima de 5mm corresponde a um resultado positivo e sua positividade não distingue infecção atual de infecção passada.

#### b.2 Sorologia (Imunofluorescência indireta e ELISA):

A sorologia mais usada é a Imunofluorescência indireta (IFI). O Ministério da Saúde do Brasil (2007) defende que nas lesões ulceradas por *L (V.) braziliensis* a sensibilidade da IFI é de 70%, no primeiro ano da doença, enquanto que, nas lesões por *L(V.) guyanensis* a sensibilidade é menor.

Silveira *et al.*, (1999) obtiveram 26,7% de positividade em pacientes humanos com a doença, sendo que no grupo sem história prévia para LTA, a positividade foi de 4%. Neste último grupo, foi realizada sorologia para doença de Chagas, que revelou positividade em 22,73%, sugerindo reação cruzada com outros tripanossomatídeos.

A técnica de Elisa é mais específica do que a imunofluorescência indireta, porém não está disponível com facilidade.

#### c) Histopatológicos

##### c.1 Hematoxilina-eosina( HE):

Magalhães *et al.*, (1986) estudaram 378 casos de leishmaniose tegumentar americana causados pela *Leishmania( V.) braziliensis*, encontrando o parasita em 63,7% das lesões cutâneas e em 37,5% das lesões mucosas. O diagnóstico histopatológico de certeza só é possível mediante o achado dos parasitas. Caso contrário, as alterações anatomopatológicas são, no máximo, sugestivas do diagnóstico.

##### c.2 Imunohistoquímica:

Weigle *et al.*, (1987) defende o uso da técnica de imunohistoquímica no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana, podendo-se identificar as formas amastigotas.

#### d) Moleculares

##### d.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR):

É um exame que permite amplificar em escala exponencial sequências de DNA da *leishmania*. Segundo Brujin e Barker (1992), o PCR pode detectar quantidades tão pequenas quanto um fentograma do parasita. Gontijo (1997) detectou em nosso meio uma sensibilidade de 98,41% e especificidade de 95,59% no diagnóstico da LTA, representando o método de escolha no diagnóstico da LTA.

### 1.8 TRATAMENTO

As drogas de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes (Sb+5), estando disponível no Brasil: o antimoniato-N-metil-glucamina (Antimoniato de meglumina) e o estibogluconato de sódio.

O antimoniato de meglumina (Glucantime 405 MG / 5 ml) é administrado conforme as recomendações da Organização Mundial de saúde (OMS), conforme tabela abaixo:

Tabela 2 - Esquema terapêutico preconizado para as diversas formas clínicas de LTA

Forma Clínica	Dose	Tempo de Duração
<b>Leishmaniose Cutânea</b>	10-20 mg/Sb <sup>+5</sup> /kg/dia Recomenda-se 15 mg/Sb+5/kg/dia	20 dias
<b>Leishmaniose Cutânea Difusa</b>	20 mg/Sb <sup>+5</sup> /kg/dia	20 dias
<b>Leishmaniose Mucosa</b>	20 mg/Sb <sup>+5</sup> /kg/dia	30 dias

Fonte: SVS - Manual de Leishmaniose Tegumentar Americana, 2006.

Após a cura clínica das lesões cutâneas, o paciente pode permanecer curado, reativar lesões cicatrizadas ou complicar com a forma mucosa.

Tratamentos incompletos ou irregulares, além do fenômeno de cicatrização espontânea associam-se com maior risco de complicações mucosas (BRASIL, 2010).

### 1.9 PROFILAXIA

Além das mudanças ambientais provocadas pelo homem, a grande diversidade de reservatórios, vetores e espécies de *Leishmania* favorecem as dinâmicas mudanças nos padrões epidemiológicos da doença, dificultando ações de controle desta antropozoonose.

Deteção precoce de casos suspeitos, aliada a tratamento imediato dos doentes diagnosticados favorece a redução do impacto da expansão desta patologia. Algumas medidas contribuem para a redução à exposição aos vetores, tais como usar roupas que cubram a

superfície exposta do corpo, repelentes, evitar os horários de maior circulação dos flebotomíneos (BRASIL, 2010).

#### 1.10 *LEISHMANIA* RNA VÍRUS

O primeiro relato de vírus infectando protozoários foi descrito na *Entamoeba histolytica* por Miller em 1960. Subsequentemente, nas seguintes décadas, vírus RNA de fita dupla foram associados à *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis* (WANG; WANG, 1986). Apenas em 1988, Tarr *et al.*, registraram estes vírus na *Leishmania*.

Em 1992, Guilbride *et al* isolaram vírus da *leishmania* em 12 cepas de *L (V.) braziliensis* e *L (V.) guyanensis*, em amostras provenientes da bacia Amazônica, denominados de *Leishmania* RNA vírus 1 (LRV 1). No mesmo ano, Stuart *et al.*, identificaram a sua sequência completa, correspondendo a uma sequência de 5284 nucleotídeos.

Conforme Gupta *et al.*, (2007), a família *Totiviridae* engloba três gêneros de vírus RNA de cadeia dupla: *Totivirus*, *Giardiavirus* e *Leishmania virus*. Trata-se de um vírus RNA de fita dupla, de 5,7 Kb de comprimento, pertencente à família *Totiviridae*, que ao parasitar o protozoário, teria um suposto papel amplificador da resposta inflamatória aos antígenos da *Leishmania* e ao mesmo tempo agiria subvertendo a capacidade de resolução da infecção pelos macrófagos do hospedeiro humano (TARR *et al.*, 1988).

Saiz *et al.*, (1998) demonstrou que o LRV 1 existe em peças de biópsia cutânea antes da manipulação em cultivo de laboratório, comprovando assim a existência “in vivo” deste vírus infectando a *leishmania*, derrubando a hipótese dele se tratar de um artefato laboratorial. Neste estudo o LRV1 foi encontrado em 2 (18%) de 11 amostras. Ogg *et al.*, (2003) encontrou o LRV em 12 (25,5%) de 47 amostras de lesões cutâneas em atividade, em processo de cicatrização ou cicatrizadas, além de 1 caso de cutâneo-mucosa. Tal trabalho não achou associação entre o número de cópias do LRV com a forma clínica, porém não foram identificadas as respectivas espécies de *leishmania* e nem descritas características intrínsecas de cada lesão como número de úlceras, localização ou diâmetro.

Salinas (1996) afirma que o *Leishmania* RNA vírus tipo 1 (LRV 1) coinfecta cepas de *L(V.) braziliensis* e *L(V.) guyanensis* e Wildmer *et al.*, (1995) relata que algumas cepas de *L (V.) guyanensis* e *L (V.) braziliensis* estão persistentemente infectadas por este vírus RNA de fita dupla, não envelopado. A *L(L.) major* é infectada pelo *Leishmania* RNA vírus tipo 2

(LRV 2). Estes dois vírus apresentam divergências genéticas e co-evoluíram com as respectivas espécies de *Leishmania*, no Novo e Velho Mundo, respectivamente.

Ives *et al.*, (2011) relacionaram altas cargas de LRV1 como fator que favorece a persistência parasitária, capacidade de evasão e de metástase da *Leishmania*. Defende que as cepas metastatizantes de *Leishmania (V.) guyanensis* para mucosas, são portadoras de uma alta carga de LRV1.

Pereira *et al.*, (2013) em seu estudo de 48 casos, pesquisaram a presença do LRV1 em 40 pacientes oriundos de região endêmica do Rio de Janeiro e em 8 pacientes das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Não encontraram a presença do LRV1 nas cepas de *L.(V.) braziliensis* do estado Do Rio de Janeiro, mesmo em casos de LCM, tendo encontrado o vírus apenas em 2 casos das infecções por *L.(V.) guyanensis* da região Norte. Estes 2 pacientes apresentaram recidiva após a cura clínica de suas lesões primárias. Tal achado sugere que as cepas da região do Rio de Janeiro podem não apresentar a coinfeção com o LRV-1, parecendo haver distribuição geográfica limitada à região Norte. A recidiva nos 2 casos coinfectados pelo LRV-1 levanta a suspeita de que o vírus possa ter participação na não resolução da doença.

O papel deste vírus na patogenia da LTA permanece enigmático, sendo necessários maiores avanços no entendimento desta endossimbiose.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Os mecanismos patogênicos envolvidos na LTA ainda não se encontram totalmente esclarecidos e a utilização de marcadores prognósticos confiáveis deve contribuir para um melhor entendimento do desfecho clínico de cada caso. A identificação dos pacientes cujo parasita infectante esteja associado a um risco elevado de indução das formas mais graves, reforçaria a adoção de medidas alternativas de tratamento, uma vez que todas as formas clínicas iniciais são tratadas igualmente com o antimoniato de meglumina.

A presença do LRV infectando espécies de *Leishmania* é capaz de interferir na forma de apresentação clínica da LTA?

Inúmeros estudos tem sugerido que o LRV atua como cofator determinante da forma hiperérgica mucocutânea. Ao parasitar o protozoário, teria um suposto papel amplificador da

resposta inflamatória aos antígenos da *Leishmania* e ao mesmo tempo agiria subvertendo a capacidade de resolução da infecção pelos macrófagos do hospedeiro humano (TARR *et al.*, 1988).

Ives *et al.*, (2011) confirmaram que cepas metastatizantes de *Leishmania guyanensis* apresentam altos níveis de RNA do LRV e maior capacidade de ativar citocinas inflamatórias, favorecendo a ocorrência de formas mucosas.

Cantanhêde (2013) em sua dissertação de mestrado encontrou a presença do LRV nas lesões mucosas em 56% dos casos, no estado de Rondônia. Deste modo, apesar de não ser o único elemento determinante na evolução dos doentes, a presença do LRV constitui um importante fator ligado a casos de LCM.

Habitualmente, a forma cutânea antecede as formas mucosas de LTA. Já na forma cutânea inicial da LTA, teria o LRV capacidade de influenciar as características clínicas destas lesões? Llanos-Cuentas (1984) associaram possível maior risco de desenvolvimento de lesões mucosas em pacientes com lesões cutâneas múltiplas e extensas, duração prolongada e localização acima da cintura pélvica.

De um lado, a presença do LRV apresenta uma maior tendência de complicação mucosa e por outro, as características das lesões, possivelmente podem representar um pior prognóstico, de caráter metastatizante. O cruzamento destas informações, LRV e padrão inicial das lesões cutâneas, pode fornecer um importante avanço na avaliação prognóstica destes doentes.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Descrever a presença do LRV-1 parasitando espécies de *Leishmania*, e associando-a com as diferentes formas de apresentação clínica.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Classificar as formas clínicas de Leishmaniose tegumentar americana (LTA), caracterizando-as em cutâneas puras (única, múltipla, disseminada e forma recidiva cútis), cutânea anérgica difusa, cutâneo-mucosa (tardia, concomitante e contígua) e mucosa

(primária e indefinida), dentro do universo de pacientes que comparecerem espontaneamente e que forem referenciados ao ambulatório de dermatologia do Centro de Medicina Tropical de Rondônia (CEMETRON), que é referência estadual para casos de LTA.

- Identificar as espécies de *Leishmania* causadoras de cada caso clínico;
- Determinar se estas espécies de *Leishmania* estão infectadas pelo LRV-1, através de estudo PCR, associando com a apresentação clínica de cada caso, levando-se em conta características das lesões como número, localização, diâmetro da úlcera maior ou menor do que 2,5 cm e presença ou ausência de adenomegalia.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 TIPO DE ESTUDO**

Pesquisa observacional, transversal e descritiva.

### **4.2 LOCAL DO ESTUDO**

O estudo foi conduzido na cidade de Porto Velho, capital do estado de Rondônia, situada na margem direita do Rio Madeira, situada a 85 metros acima do nível do mar, clima tropical super úmido predominante, área territorial de 34 mil Km<sup>2</sup>, com população estimada em 484.992 mil habitantes em 2013, conforme estimativa do IBGE em 2010.

A sede física do trabalho foi realizada no ambulatório de dermatologia do CEMETRON, sendo é um hospital de 100 leitos que funciona como centro de referência em medicina tropical para o estado de Rondônia. Seu raio de abrangência é de aproximadamente 250 km e a população diretamente coberta pelo serviço é de cerca de 480 mil habitantes.

### **4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO**

No período compreendido entre os meses de abril a setembro de 2013, foram triados todos os casos de doença cutânea com duração menor do que seis meses que compareceram espontaneamente ou que foram referenciados ao Ambulatório de Dermatologia do hospital CEMETRON. Os pacientes foram atendidos diariamente de segunda a sexta feira e avaliados por sua história clínica e epidemiológica. Os casos com exame laboratorial positivo, tanto na pesquisa direta de *Leishmania* e/ou por biologia molecular – PCR, foram incluídos na pesquisa e tratados conforme protocolo padronizado do Ministério da Saúde (BRASIL, 2010).

Em todos os pacientes foram realizados testes sorológicos (ELISA) para pesquisa de HIV, seguindo recomendações da portaria nº 59 de 28 de janeiro de 2003 do Ministério da saúde (BRASIL, 2003). As sorologias para HIV foram realizadas no laboratório do Hospital CEMETRON, em Porto Velho, Rondônia.

#### 4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo todos os pacientes com faixa etária entre 12 e 80 anos, com suspeita clínica de LTA e que aceitaram as condições do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Nos casos de menores, a inclusão foi realizada somente após permissão de um maior responsável.

#### 4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo os casos:

1. Crianças menores de 12 anos
2. Grávidas
3. Indígenas
4. Doentes mentais
5. Incapazes
6. Duração da doença acima de 6 meses
7. Não coleta da amostra para PCR

#### 4.6 PROCEDIMENTOS DE COLETA

Após cumprirem os critérios de inclusão e exclusão e assinarem o TCLE, os pacientes atendidos no Ambulatório de Dermatologia do hospital CEMETRON, foram submetidos a um formulário específico que tinha por finalidade coletar informações dos mesmos, investigando a história clínica e epidemiológica, conforme apêndice B.

Após preenchimento do formulário, os pacientes foram submetidos a coleta de material da lesão cutânea com escova cervical estéril e posteriormente essa amostra foi submetida a estudos moleculares, com o objetivo de confirmar a infecção e identificar a espécie de *Leishmania* e LRV.

O estudo foi realizado em perfeita sincronização entre a equipe de Dermatologia ambulatorial do CEMETRON, localizado na cidade de Porto Velho - Rondônia e o apoio

logístico dos laboratórios de Epidemiologia Genética e Biotecnologia da FIOCRUZ RO, que já dispõem de técnicas de detecção do *Leishmania* RNA vírus (RT-PCR- Reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa).

#### 4.7 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA

A classificação clínica da forma cutânea dos pacientes foi realizada com base no trabalho de Turetz *et al.*, (2002), onde a LCDB foi descrita como a presença de 10 ou mais lesões, com múltiplos padrões (papulares, nodulares, acneiformes e ulceradas) em 2 ou mais regiões distintas do corpo (cabeça, tronco, braço e pernas) e as formas localizadas como número menor do que 10 lesões em qualquer região do corpo ou número maior do que 9 na mesma região corporal. Já a LCAD, foi caracterizada como a presença de inúmeros nódulos não ulcerados. Costa *et al.*, (2009) definem a forma recidiva cútis como a presença de lesões nodulares, em torno ou no interior de uma cicatriz prévia por *Leishmania*.

Dentro do universo da LCL, os doentes foram divididos em portadores da LCLU, quando apresentavam uma única lesão e em LCLM, quando possuíam mais de uma lesão.

Quando houve acometimento de mucosas, estas foram classificadas em LCM, caracterizada pelo envolvimento associado de pele e mucosas ou LM, quando o envolvimento mucoso se deu de maneira isolada.

#### 4.8 TESTES MOLECULARES

O material coletado foi estocado imediatamente em solução de RNALater® (Ambion) para preservar os ácidos nucleicos e transportadas ao Laboratório de Epidemiologia Genética da Fiocruz a temperatura ambiente.

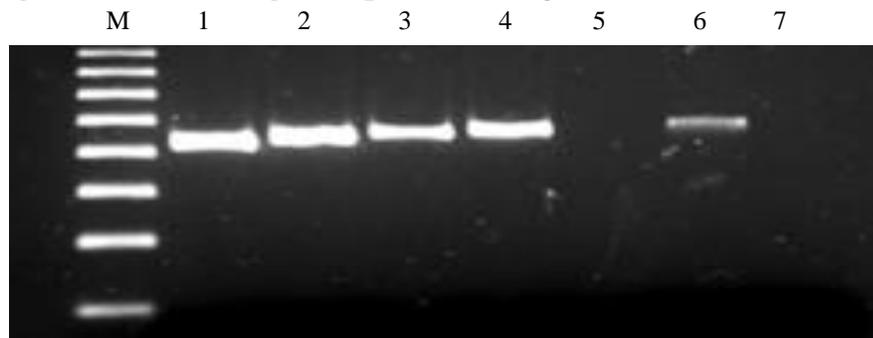
##### 4.8.1 Extração de DNA e RNA

As extrações de DNA e RNA foram realizadas utilizando os kits comerciais Purelink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®) e Purelink RNA Mini Kit (Ambion®) respectivamente, seguindo-se as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi utilizado para as reações em cadeia da polimerase para a confirmação da infecção por *Leishmania*, enquanto o RNA foi utilizado para detecção do *Leishmania* RNA vírus.

##### 4.8.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Transcrição Reversa (RT-PCR)

A PCR para confirmação da infecção foi realizada tendo como alvo a amplificação de parte do gene da proteína do choque térmico 70 (hsp70) conforme descrito por Da Graça em 2012 com adaptações. O fragmento amplificado na reação foi submetido a digestão enzimática com duas enzimas de restrição a fim de identificar a espécie de *Leishmania* que estava causando a infecção. Após a confirmação e caracterização da espécie do parasita, foram realizados os testes para detecção do vírus. A partir do RNA extraído, foi sintetizado o DNA complementar (cDNA), reação conhecida por Transcrição Reversa (RT-PCR) utilizando uma enzima específica. O cDNA foi submetido a uma PCR para amplificação de um fragmento do LRV utilizando um par de iniciadores específicos. Os resultados das reações eram visualizados em géis de Agarose (Figura 4) em diferentes concentrações conforme o tamanho dos fragmentos amplificados.

**Figura 10 - Gel de Agarose par visualização dos resultados do PCR**



**Gel de agarose a 2% corado com GelRed. M: marcador de peso molecular de 50 pares de bases; 1 a 4: amostras positivas para *Leishmania*; 5: controle negativo da reação; 6: controle positivo da reação; 7: Branco**

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram inseridos e tabulados no software Microsoft Excel 2007, depois analisados pelos softwares Epi Info (DEAN *et al.*, 1994) versão 7 e Bioestat (AYRES *et al.*, 2007) versão 5.0.

As variáveis quantitativas foram descritas através de médias e desvios-padrão e as variáveis qualitativas através de suas frequências.

Considerou-se como variável dependente o LRV-1 positivo e como variáveis independentes os seguintes fatores: sexo, procedência, localização, diâmetro, adenomegalia, número de lesões e grupo etário. Empregou-se, inicialmente, a regressão logística univariada.

As variáveis entraram para o modelo múltiplo quando o seu nível de significância foi menor do que 0,20. A entrada das variáveis na regressão logística múltipla seguiu o método *stepwise forward*. O nível de significância estabelecido foi de 0,05.

#### 4.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os pacientes que procuraram atendimento no ambulatório de dermatologia do hospital CEMETRON/CEPEM foram informados, durante a primeira consulta, de que seus dados clínicos e laboratoriais registrados em prontuários individuais e disponibilizados para estudos científicos.

Tal termo de consentimento não submeteu o paciente a sofrimento desnecessário, pois tais recursos diagnósticos já fazem parte das diretrizes do Ministério da Saúde. De fato, apenas facultou a participação do referido indivíduo na estatística do trabalho, que vislumbra um benefício social futuro de grande repercussão prática na saúde pública brasileira.

No caso desta pesquisa, a princípio, foi obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), assinado por todos os pacientes que aceitaram participar deste estudo. A pesquisa foi realizada de acordo com os princípios estipulados pela Assembleia Médica Mundial de 1975 e do Ministério da Saúde (Resolução 196/1996). O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética do CEPEM (ANEXO 1).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

No período de abril a setembro de 2013, foram atendidos 41 pacientes com quadro clínico sugestivo de LTA e com evolução menor do que 6 meses. Todos foram confirmados por meio de pesquisa direta do parasita e/ou pela PCR, sendo que 8 destes foram excluídos por não terem comparecido à coleta de amostra para PCR, de acordo com a tabela 3.

Tabela 3 - Pacientes excluídos do estudo por não coletar a amostra para PCR

Pacientes com LTA	Pacientes excluídos	Pacientes incluídos
41	8	33

Dos casos estudados, 28 (84,9%) eram do sexo masculino e 5 (15,1%) eram do sexo feminino, conforme tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição dos casos em relação ao sexo

Sexo	Número (%)
Feminino	5 (15,1%)
Masculino	28 (84,9%)
Total	33

Observou-se que a faixa etária variou entre 13 a 61 anos, com idade média e desvio padrão de  $36,0 \pm 14,6$  anos. Houve maior número de casos entre adultos jovens (20 a 49 anos),  $\chi^2 = 11,455$ ; valor-p = 0,0033, tendo sido observados 20 (60,6%) pacientes. Em idosos acima de 50 anos, houve 8 (24,2%) e em pacientes abaixo de 20 anos apenas 5 (15,2%) casos. A classe abaixo de 20 anos somada ao grupo de acima de 50 anos resultou em 13 (39,4%) doentes. A distribuição etária é demonstrada na tabela 5.

Tabela 5 - Distribuição de casos em relação a faixa etária

Idade	Número (%)
< 20 anos	5 (15,2%)
20 a 49 anos	20 (60,6%)
> 50 anos	8 (24,2%)
Total	33

Mais da metade dos indivíduos adquiriu a doença em focos rurais, no interior do estado de Rondônia, onde ocorre ciclo de transmissão silvestre, totalizando 22 casos (66,7%). Os pacientes procedentes de Porto Velho somaram 11 casos (33,3%), porém todos com concomitante atividade no meio silvestre como extrativismo, desmatamento, pesca, caça, ecoturismo, treinamento militar, retiros religiosos em fazendas, etc. A procedência é ilustrada na tabela 6.

Tabela 6 - Distribuição dos casos quanto à procedência

Procedência	Número (%)
Rural	22 (66,7%)
Capital	11 (33,3%)
Total	33

## 5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO

Observou-se que 32 (96,9%) indivíduos deste estudo eram portadores da forma cutânea pura, havendo envolvimento mucoso concomitante em 1 (3,1%) único portador da LCDB, mas nenhum caso da forma recidiva cútis, mucosa ou anérgica.

De acordo com a classificação clínica de Turetz *et al.*, (2002), constataram 31 casos de LCL, sendo 20 (60,7%) com a forma cutânea localizada única e 11 (33,3%) da forma cutânea localizada múltipla, somando 94%, e 2 (6,0%) da LCDB, devidamente registrada na tabela 7.

Tabela 7 - Distribuição de casos conforme forma clínica de LTA

Forma clínica de LTA	Número (%)
LCL única	20 (60,7%)
LCL múltipla	11 (33,3%)
LCDB	2 (6,0%)
Total	33

O aspecto clínico destas úlceras foi o clássico, havendo bordas elevadas, fundo granuloso, exsudativo e indolor.

Em relação à localização, 12 (36,3%) apresentaram lesões exclusivamente acima da cintura pélvica e 16 (48,5%) com lesões exclusivamente abaixo da mesma. Nesta amostra, predominaram as lesões em membros inferiores totalizando 21 indivíduos (63,7%), de modo que 5 (15,2%) apresentaram simultaneamente úlceras abaixo e acima da cintura pélvica. A localização das úlceras pode ser avaliada na tabela 8.

Tabela 8 - Distribuição dos casos conforme localização das lesões

Localização das úlceras	Número (%)
> Cintura pélvica	12 (36,3%)
< Cintura pélvica	16 (48,5%)
< e > Cintura pélvica	5 (15,2%)
Total	33

Na primeira consulta, observou-se a presença de infecção bacteriana secundária em 7 (21,2%) das úlceras cutâneas, traduzindo-se pela presença de secreção purulenta e crostas melicéricas.

Em relação ao diâmetro das lesões, o tempo médio de evolução das úlceras foi de 32 dias ( $\pm 7$  dias). 15 (45,5%) pacientes evoluíram com úlceras acima de 2,5cm de diâmetro e 18 (54,5%) abaixo de 2,5 cm. As úlceras com diâmetro acima de 2,5 cm de diâmetro predominaram em membros inferiores, somando 9 (60%) das 15 lesões. As úlceras com diâmetro abaixo de 2,5 cm predominaram acima da cintura pélvica totalizando 11 (61,1%) das 18 feridas. Distribuição baseada no diâmetro, conforme tabela 9.

Tabela 9 - Distribuição de casos conforme diâmetro das úlceras

Diâmetro das úlceras	Número (%)
> 2,5 cm	15 (45,5%)
< 2,5 cm	18 (54,5%)
Total	33

Adenomegalia e linfangite satélites ocorreram em 20 (60,6%) dos avaliados, conforme tabela 10.

Tabela 10 - Distribuição dos casos conforme adenomegalia

Adenomegalia	Número (%)
Presente	20 (60,6%)
Ausente	13 (39,4%)
Total	33

### 5.3 EXAMES LABORATORIAIS

Todos os pacientes deste estudo foram submetidos à exame triagem sorológica para HIV, que resultou negativa.

Todos os pacientes que obtiveram pesquisa direta positiva, também o foram na técnica da PCR. Em apenas 5 (15,2%) pacientes não foi possível verificar o parasita através da pesquisa direta nas lesões, estando a sensibilidade deste método nas úlceras cutâneas estudadas com menos de 6 meses de evolução, na casuística deste estudo, em torno de 84,8%, conforme tabela 3. Nestes 5 pacientes, o tempo de evolução das úlceras variou entre 5 a 90 dias (média de 44 dias) e em relação à espécie de *Leishmania* causadora, 3 foram pela *Leishmania (V.) braziliensis* e 2 pela *Leishmania (V.) guyanensis*. A sensibilidade da pesquisa direta é demonstrada na tabela 11.

Tabela 11 - Percentual de positividade conforme método diagnóstico utilizado

Método diagnóstico	Positivos Número (%)	Negativos Número (%)	Total
Pesquisa direta	28 (84,8%)	5 (15,2%)	33 (100%)
PCR	33 (100%)	0 (0%)	33 (100%)

Foi possível a identificação da espécie de *Leishmania* em todas as amostras, destacando-se a *Leishmania (V.) braziliensis* com 24 (72,7%), seguida da *Leishmania (V.) guyanensis* com 8 (24,3%) e da *Leishmania (V.) shawi* com 1 (3,0%) único caso. As duas formas disseminadas bordelines foram geradas por *Leishmania (V.) braziliensis*. A distribuição das espécies é realizada na tabela 12.

Tabela 12 - Distribuição dos casos conforme a espécie de *Leishmania*

Espécie de <i>Leishmania</i>	Número (%)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	24 (72,7%)
<i>L. (V.) guyanensis</i>	8 (24,3%)
<i>L. (V.) shawi</i>	1 (3,0%)
Total	33

#### 5.4 ASSOCIAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL

Dentro do universo de 24 pacientes infectados pela *Leishmania (V.) braziliensis*, 15 (62,5%) possuíam uma úlcera, 7 (29,2%) possuíam 2 a 10 úlceras e 2 (8,3%) possuíam mais de 10 úlceras. Em relação aos infectados pela *Leishmania (V.) guyanensis*, que somaram 8, metade incluiu uma úlcera e a outra metade incluiu 2 a 10 úlceras. A *Leishmania (V.) shawi* infectou apenas um doente com uma única úlcera. A relação das espécies com o número de úlceras pode ser observada na tabela 13.

Tabela 13 - Distribuição dos casos por *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) guyanensis* conforme número de úlceras

Espécie	Número de úlceras	Número (%)
<i>Leishmania braziliensis</i>	1	15 (62,5%)
	2 – 10 úlceras	7 (29,2%)
	> 10 úlceras	2 (8,3%)
<i>Leishmania guyanensis</i>	1	4 (50%)
	2 – 10 úlceras	4 (50%)

As lesões causadas pela espécie *Leishmania (V.) braziliensis* associaram-se mais com úlceras menor do que 2,5 cm e as lesões geradas pela *Leishmania (V.) guyanensis* com úlceras maiores que 2,5 cm, devidamente demonstrado na tabela 14.

Tabela 14 - Distribuição do Número de Casos correlacionando o diâmetro da úlcera com as espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*

Espécie	Diâmetro > 2,5 cm Número (%)	Diâmetro < 2,5 cm Número (%)	Total
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	9 (37,5%)	15 (62,5%)	24 (100%)
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	5 (62,5%)	3 (37,5%)	8 (100%)

O LRV1 foi encontrado em 8 (24,2%) amostras de *Leishmania* tendo sido convencionado que o grupo A representa os pacientes infectados pelo LRV1 e o grupo B os não infectados pelo vírus.

No grupo A, os 8 (100,0%) pacientes eram do sexo masculino. A faixa etária variou entre 13 a 58 anos com idade média e desvio padrão de  $36,2 \pm 20,2$  anos, sendo que 7 (87,5%) pacientes apresentaram idade abaixo de 20 anos ou acima de 50 anos e apenas 1 (12,5%) possuía idade entre 20 a 49 anos. 5 (62,5%) indivíduos eram provenientes do meio rural e 3 (37,5%) da capital. Avaliando-se o número de úlceras, 3 (37,5%) pacientes cursaram com uma úlcera e 5 (62,5%) com mais de duas úlceras. 5 (62,5%) das 8 amostras foram provenientes de úlceras acima da cintura pélvica. 6 (75,0%) pacientes possuíam úlceras com diâmetro maior do que 2,5 cm e apenas dois (25,0%) evoluíram com úlcera de diâmetro menor do que 2,5cm, sendo que um destes era portador da forma disseminada borderline somando vinte feridas. 5 (62,5%) pacientes possuíam adenomegalia. O LRV 1 associou-se com *Leishmania (V.) braziliensis* em 6 (75,0%) e em 2 (25,0%) doentes com *Leishmania (V.) guyanensis*.

No grupo B, foram encontrados 25 (75,8%) pacientes. 20 (80%) eram do sexo masculino e 5 (20%) do sexo feminino. A faixa etária variou entre 14 a 61 anos, com idade média e desvio padrão de  $35,9 \pm 12,6$  anos, sendo que 6 (24,0%) pacientes apresentaram idade abaixo de 20 anos ou acima de 50 anos e 19 (76,0%) possuía idade entre 20 a 49 anos. 17 (68,0%) indivíduos eram provenientes do meio rural e 8 (32,0%) da capital. Avaliando-se o número de úlceras, 17 (68%) pacientes cursaram com uma úlcera e 8 (32%) com mais de duas úlceras. 12 (48,0%) das 25 amostras foram provenientes de úlceras acima da cintura pélvica. 9 (36,0%) pacientes possuíam úlceras com diâmetro maior do que 2,5 cm e 16 (64,0%) evoluíram com úlcera de diâmetro menor do que 2,5cm. 15 (60,0%) pacientes possuíam adenomegalia. *Leishmania (V.) braziliensis* foi identificada em 18 (72%) pacientes, *Leishmania (V.) guyanensis* em 6 (24%) e a *Leishmania (V.) shawi* em 1 (4%). Os dados dos grupos A e B estão ilustrados na tabela 15.

Tabela 15 - Característica clínicas e sócio demográficas associadas ao grupo de pacientes portadores de LTA infectados pelo LRV-1 e não infectados pelo LRV-1

<b>Características</b>	<b>Número</b>	<b>LRV-1 positivo (Grupo A)</b>	<b>LRV-1 negativo (Grupo B)</b>
<b>Sexo</b>			
Masculino	28	8 (100%)	20 (80%)
Feminino	5	0 (0%)	5 (20%)
<b>Idade</b>			
< 20 anos e > 49 anos	13	7 (87,5%)	6 (24%)
20-49 anos	20	1 (12,5%)	19 (76%)
<b>Procedência</b>			
Rural	22	5 (62,5%)	17 (68%)
Capital	11	3 (37,5%)	8 (32%)
<b>Número de lesões</b>			
1 lesão	20	3 (37,5%)	17 (68%)
> 2 lesões	13	5 (62,5%)	8 (32,0%)
<b>Localização das lesões</b>			
> cintura pélvica	17	5 (62,5%)	12 (48,0%)
Outras Localizações	16	3 (37,5%)	13 (52,0%)
<b>Diâmetro</b>			
> 2,5 cm	15	6 (75,0%)	9 (36,0%)
< 2,5 cm	18	2 (25,0%)	16 (64,0%)
<b>Adenomegalia</b>			
Sim	20	5 (62,5%)	15 (60,0%)
Não	13	3 (37,5%)	10 (40,05)
<b>Espécie de <i>Leishmania</i></b>			
L. (V.) <i>braziliensis</i>	24	6 (75,0%)	18 (72,0%)
L. (V.) <i>guyanensis</i>	8	2 (25,0%)	6 (24,0%)
L. (V.) <i>shawi</i>	1	0 (0%)	1 (4,0%)

Na Tabela 16, observam-se os detalhes da análise univariada realizada com todas variáveis envolvidas no estudo. As variáveis diâmetro, número de lesões e grupo etário foram selecionadas para o modelo múltiplo, uma vez que tiveram um nível de significância menor do que 0,20.

Tabela 16 - Análise univariada das variáveis estudadas para a presença do LRV-1

Fatores de risco	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	p-valor
Sexo	0,00	0 – 1,0 x 10 <sup>12</sup>	0,97
Procedência	0,78	0,15 - 4,12	0,77
Localização	1,81	0,35 - 9,24	0,48
Diâmetro	6,38	1,05 – 38,85	0,04
Adenomegalia	1,11	0,22 – 5,72	0,90
Número de lesões	3,54	0,67 – 18,62	0,14
Grupo etário	0,04	0,00 – 0,44	0,01

Os resultados da análise de regressão logística múltipla mostraram que somente a idade (OR = 0,04; IC95%: 0,01 – 0,44) se manteve estatisticamente associado com a positividade para o LRV-1, ou seja, há uma chance de 25 vezes menor de possuir LRV-1 positivo se a pessoa estiver na idade entre 20 a 49 anos, p-valor = 0,01, como demonstrado na tabela 17.

Tabela 17 - Regressão logística múltipla dos fatores de risco para a positividade do LVR-1

Fatores de risco	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	p-valor
Diâmetro	4,02	0,46 – 35,07	0,21
Número de lesões	3,97	0,46 – 34,35	0,21
Grupo etário de 20 a 49 anos	0,04	0,01 – 0,44	0,01

## 6 DISCUSSÃO

A LTA constitui um sério e negligenciado problema de saúde pública mundial, estando distribuída em vários países do globo terrestre, havendo mais de 350 milhões de pessoas com risco de adquirir esta infecção, segundo Von Stebut, 2007.

Prognóstico significa prever o futuro curso de uma doença. Royston (2009) enfatiza que prognosticar é prever acuradamente a evolução da doença, facilitando a orientação e aconselhamento dos doentes. Em relação à LTA, é possível o estabelecer o diagnóstico e implantar a terapêutica específica. No entanto, não se tem domínio pleno da evolução clínica destes doentes, havendo pouca consistência na literatura.

Este estudo analisou a conexão da infecção pelo LRV-1 e a apresentação clínica inicial com menos de 6 meses, tendo em vista características das úlceras cutâneas como: número de lesões ulceradas; localização acima da cintura pélvica *versus* outras localizações; diâmetro da área ulcerada maior ou menor do que 2,5 cm e presença ou ausência de adenomegalia concomitante. Também teve o cuidado de identificar as espécies de *Leishmania* infectantes, visando fazer correlações mais amplas.

Molinet (2013) em sua tese de doutorado estudou 178 pacientes levando-se em conta falha terapêutica em pacientes tratados com antimonio de meglumina *versus* algumas características clínico-laboratoriais como: localização das lesões acima da cintura pélvica *versus* outras localizações; área ulcerada com diâmetro  $\geq$  a 2,5cm<sup>2</sup>; diâmetro da reação de Montenegro  $\leq$  a 15 mm; aparecimento de acometimento linfático antes da lesão cutânea e presença de qualquer outro sintoma nas lesões de pele. Na amostra estudada por Molinet, as variáveis acima demonstraram independentemente associação significativa ao desfecho de falha terapêutica, porém não foi possível estabelecer um escore de prognóstico que pudesse ser utilizado de maneira simples em condições de campo. Este estudo avaliou a resposta clínica dos doentes ao final de 90 dias do término do tratamento, porém não avaliou o comportamento dos mesmos a longo prazo, ou seja, em termos de anos, limitando conclusões mais amplas a respeito do desfecho clínico definitivo.

A falha terapêutica ao antimonio de meglumina caminha paralelamente aos possíveis efeitos da presença do LRV-1 na LTA, uma vez que a falha ao tratamento inicial aumenta a probabilidade de complicações mucosas, assim como a população de *Leishmania* infectada pelo LRV-1 tem maior poder metastatizante para mucosas, conforme Ives *et al.*, (2011).

No grupo de avaliados, oito doentes foram excluídos do estudo por não ter sido possível a realização da coleta de amostra para PCR, o que limitava a identificação da espécie de *Leishmania* causadora e a pesquisa do LRV-1. Deste modo, estes oito pacientes tornaram-se inviáveis para fins de análises, conforme objetivos do trabalho.

A casuística foi de apenas 33 casos, levando-se em conta os critérios de exclusão estabelecidos e as condições climáticas de estiagem entre Abril a Setembro, época em que há uma diminuição de vetores e conseqüentemente queda no número de casos. Boecken (1996) afirma que o número de casos de LTA em Manaus aumenta com a subida do índice pluviométrico.

Dentro do universo de 33 pacientes, 28 (84,9%) eram do sexo masculino. Coelho Neto *et al.*, (2012) realizaram um estudo epidemiológico na cidade de Buriticupu no estado do Maranhão, detectando 85,7% de casos do sexo masculino. O sexo masculino é mais acometido por fatores ocupacionais, favorecendo uma maior exposição na transmissão extradomiciliar da doença, que predomina no estado de Rondônia. Lainson *et al.*, (1994) defendem que o sexo feminino e crianças em idade pré-escolar apresentam maior número de casos nas regiões onde se destaca o modelo de transmissão domiciliar. Em estados, como o Rio de Janeiro, onde se destaca a transmissão peridomiciliar, a LTA ocorre de modo semelhante em adultos e crianças de ambos os sexos (SABROZA, 1981).

Houve maior número de casos entre adultos jovens do meio rural, com idade variando entre 20 a 49 anos, e menor expressividade nos grupos acima de 50 anos e abaixo de 20 anos. Este achado reflete a relação entre o trabalho rural e a idade economicamente ativa destes profissionais do sexo masculino. Todos os pacientes deste trabalho estiveram intimamente ligados ao contato silvestre, seja profissionalmente ou em atividades alternativas de lazer.

Nesta casuística, 31 (94%) dos casos foram classificados como LCL, sendo única em 20 (60,7%) e múltipla (33,3%) em 11 doentes. Costa *et al.*, (2009) afirmam que a LCL é a forma mais comum, podendo ser única ou múltipla (até 10 lesões) e representa o acometimento primário da pele. Todas as espécies podem ocasionar a LCL, havendo diferentes prevalências entre as espécies, de acordo com a região geográfica avaliada. Castro *et al.*, (2002), no período compreendido entre 1993 a 1998, avaliou um grupo de 316 pacientes com LTA no norte do Paraná, encontrando 67% de LCL com uma única lesão e 31% com lesões múltiplas, aproximando-se dos resultados encontrados em Rondônia.

Jones *et al.*, (1987) relataram que no início da década de 70, a LCDB representava apenas 0,2% dos casos. Turetz *et al.*, (2002) em seu estudo de 2206 casos de LTA, relataram que 42 (1,9%) eram portadores da LCDB, acometendo predominantemente o sexo masculino, idade acima de 19 anos e agricultores. 12 (29%) dos 42 pacientes apresentaram envolvimento

mucoso. O número médio de úlceras foi de 18 por paciente. Nos 7 pacientes em que foi possível identificar a espécie, isolou-se a *Leishmania (V.) braziliensis*. Rosa (2012) em sua tese de doutorado acompanhou 121 casos de LCDB na região de Corte da Pedra na Bahia, constatando acometimento mucoso em 50% dos indivíduos e em 97% das vezes, a *Leishmania (V.) braziliensis* foi o agente etiológico.

Em conformidade com a literatura, os 2 casos de LCDB pesquisados neste trabalho foram gerados pela *Leishmania (V.) braziliensis*, que infectou agricultores masculinos e com idade acima de 19 anos. O número médio de úlceras foi de 17,5 úlceras por doente. Nota-se um nítido aumento da ocorrência da LCDB ao longo das últimas décadas, sendo que neste atual trabalho a ocorrência somou 6% do total de indivíduos, destacando-se como uma forma emergente de LTA.

Registrou-se um único caso de LCM, instalada concomitantemente a uma LCDB. Tal fato é, em parte, justificado pelos critérios de exclusão que eliminaram todos os casos com mais de 6 meses de doença. A limitação em 6 meses de evolução teve por objetivo restringir os casos de LCM, que por sua vez tendem a ocorrer após meses a anos da cicatrização da lesão cutânea primária. Houve também influência da própria demanda do ambulatório que é de dermatologia, tendo a demanda dos casos de LCM sido dirigidos ao atendimento da otorrinolaringologia. No entanto, a ocorrência precoce, antes de 6 meses de evolução, do acometimento mucoso ligou-se intrinsecamente à LCDB. A LCDB está fortemente associada à doença mucosa (TURETZ *et al.*, 2002). Não se verificou a LCAD, pois nenhum caso foi encontrado associado à *Leishmania (L.) amazonensis*, que é o agente desta forma.

Neste trabalho, dominou a ocorrência da LCL com úlceras localizadas em membros inferiores. Casqueiro (2012) avaliou na Bahia uma casuística de 173 infectados pela LTA, forma cutânea, detectando 113 (65,3%) portadores de uma única úlcera, destacando-se a localização em membros inferiores, somando em torno de 50% dos casos. Estes dados aproximam-se da estatística deste trabalho onde a LCL com uma única úlcera somou 20 (60,7%) casos, e como localização destacaram-se os membros inferiores, totalizando 16 (48,5%), quando acometidos de maneira exclusiva. Quando as lesões em membros inferiores foram somadas ao acometimento concomitante em outras regiões, abaixo e acima da cintura pélvica, o número de envolvidos somou 21 (63,7%) doentes. Este achado correlaciona-se com o tipo de transmissão extradomiciliar, uma vez que o flebotômíneo voa baixo e estes adultos

permanecem na posição vertical durante sua jornada de trabalho (LEMOS *et al.*, 2001). Seguindo o modelo de transmissão peridomiciliar clássico, nesta pesquisa foi observado que 4 (80%) dos 5 pacientes com idade inferior a 20 anos cursaram com lesões acima da cintura pélvica, uma vez que estes pacientes ficam predominantemente na posição horizontal em seus domicílios, favorecendo o alcance do flebotômico a metade superior do corpo. Brandão *et al.*, (1999) afirmam que a domiciliação da LTA tem avançado nos últimos anos e parece ser uma tendência futura. Andrade (1997) em sua tese de mestrado afirma que os flebotômicos são atraídos pelo ambiente domiciliar por causa da luz. O total de portadores de lesões acima da cintura pélvica somou 17 casos. Llanos-Cuentas (1984) associaram o envolvimento da doença acima da cintura pélvica como fator de risco para a LCM, porém não se conhece o mecanismo fisiopatológico deste evento. A cicatrização das lesões em membros inferiores é mais demorada, pelo fato de que a densidade de anexos cutâneos é menor. Contrariando a demora na cicatrização com fator de risco para LCM, a localização em membros inferiores exhibe menor risco de complicação mucosa, e é possível que a proximidade da metade superior do corpo com as mucosas nasal e oral facilite maior disseminação.

A infecção bacteriana secundária é um fenômeno comum na LTA. Bactérias que colonizam a superfície da pele passam a causar infecção, usando a úlcera da LTA como porta de entrada.

Em relação ao diâmetro, o tempo médio de evolução das úlceras foi de 61,5 dias ( $\pm$  49,7 dias). Ocorreu um discreto maior número de úlceras com diâmetro menor do 2,5cm, somando 18 (54,5%), ao passo que as úlceras maiores do que 2,5cm somaram 15 (45,5%). As úlceras maiores predominaram abaixo da cintura pélvica, distinguindo-se das úlceras menores, que predominaram acima da cintura pélvica. Bafica *et al.*, (2003) relatam que os níveis de TNF são maiores em pacientes com a forma cutânea não responsiva ao antimonio de meglumina. Oliveira *et al.*, (2011) analisaram 96 lesões de pacientes com LCL, constatando que o diâmetro da lesão correlacionava-se positivamente com a idade, tempo de cicatrização, produção de TNF- $\alpha$  e número de ciclos com antimonio de meglumina. Belkaid *et al.*, (2000) afirmam que o maior pico de carga parasitária pela *Leishmania* ocorre antes do aparecimento da úlcera, sugerindo que a úlcera resulta muito mais da resposta imune do que da carga parasitária. Na análise dos indivíduos pertencentes ao estudo em Rondônia, é possível que a localização em membros inferiores tenha favorecido a ocorrência de úlceras com diâmetro acima de 2,5 cm por 2 motivos: 1. Menor quantidade de anexos cutâneos que

contribuem para cicatrização, e 2. Efeito gravitacional, causando congestionamento na circulação venosa em membros inferiores, contribuindo para o maior dano tecidual.

Lessa *et al.*, (2007) citaram que na LTA por *Leishmania (V.) braziliensis* há o aparecimento de linfadenomegalia transitória, dias ou semanas antes do aparecimento da lesão cutânea, próximo ao local da inoculação do parasito, caracterizando-se por ser indolor ou pouco dolorosa. Isto sugere que exista uma disseminação precoce da *Leishmania* a partir do ponto de inoculação cutâneo. Tem-se observado em Rondônia que a linfadenomegalia é dolorosa quando há fenômeno de infecção bacteriana secundária nas lesões, e não raramente constata-se um padrão de linfangite em rosário. Não se pode afirmar o percentual exato de pacientes em que a linfadenopatia ocorre, sobretudo quando se leva em questão as múltiplas espécies de *Leishmania* envolvidas no desencadeamento da doença. Machado *et al.*, (2002) referem que a relevância deste sintoma na fisiopatologia da LCL não tem sido completamente esclarecida. Barral *et al.*, (1995), em uma área de transmissão da *Leishmania (V.) braziliensis*, acompanharam 10 portadores de LTA com adenomegalia prévia ao aparecimento das úlceras, sendo que 7 evoluíram com úlceras e 3 involuíram espontaneamente. Este achado sugere que a adenomegalia pode corresponder a uma manifestação da LTA, podendo ou não evoluir para doença ulcerada propriamente dita. Esta adenomegalia ainda pode persistir em percentual variável concomitantemente às úlceras cutâneas, pois Barral *et al.*, (1992) detectaram linfadenomegalia em 24 (66,7%) de 36 doentes com LTA por *Leishmania (V.) braziliensis* em sua fase inicial sem tratamento, e neste grupo foram confirmados maior resposta imune humoral e celular através das dosagens dos níveis de IgG e da reação intradérmica de Montenegro, respectivamente. Oliveira *et al.*, (2011) diagnosticaram adenomegalia em 56 (58,0%) pacientes dentro de um grupo de 96 indivíduos infectados com LCL. Sousa *et al.*, (1995) constataram a ocorrência de linfadenomegalia em 496 (77%) de 595 portadores da LTA por *Leishmania (V.) braziliensis* e citam a ocorrência de febre e hepatoesplenomegalia neste grupo, estando associadas à disseminação da *Leishmania*, sugerindo um padrão de resposta imune alterado. Molinet (2013) em sua tese de doutorado detectou acometimento linfático em 144 (80,9%) de 178 pacientes. O acometimento linfático ocorreu antes em 55 (38,4%), concomitante em 64 (44,7%) e após a cicatrização das úlceras em 25 (17,4%) pacientes. Gontijo e Carvalho (2003) defendem a instalação de adenopatia em 12 a 30% dos casos, porém sem diferenciar se esta adenomegalia tem instalação antes ou após o aparecimento das úlceras. De fato, há inúmeros relatos na literatura mencionando a ocorrência

de linfadenopatia, porém falta precisão em determinar se tal ocorrência interfere na evolução da doença. Romero *et al.*, (2001a) apontam que a linfadenopatia associada às lesões cutâneas confere fator de risco aumentado para falha terapêutica com recidiva da doença. No atual trabalho, encontrou-se uma ocorrência de linfadenomegalia regional, com ou sem linfangite, em 20 (60,7%) doentes com úlceras instaladas. Em 16 (80%) destes pacientes, houve associação com *Leishmania (V.) braziliensis* e 4 (20%) associaram-se à *Leishmania (V.) guyanensis*. Considerando os 24 casos ocasionados pela *Leishmania (V.) braziliensis*, a linfadenopatia ocorreu em 16 (66%), e nos 8 casos ligados à *Leishmania (V.) guyanensis*, a linfadenopatia ocorreu em 4 (50%). Barral *et al.*, (1992) citam que o acometimento linfático é mais comum nas infecções por *Leishmania (V.) braziliensis* do que nos casos associados a *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*.

Sorologia para HIV foi realizada em todos os indivíduos desta pesquisa, visando excluir a influência do HIV na disseminação da doença. De acordo com Guerra *et al.*, (2011b), a coinfeção com o HIV favorece a ocorrência de doença mucosa em 46,7% a 68%, ao passo que nos mono infectados apenas pela *Leishmania*, a LCM se dá em apenas 1,5% dos portadores de LTA.

Nesta casuística, a sensibilidade da pesquisa direta foi de 84,8%. O achado do parasita é o padrão ouro para o diagnóstico da doença, uma vez que há muitas doenças que fazem diagnóstico diferencial. No entanto, o não encontro do protozoário não exclui o diagnóstico, que pode ser confirmado por técnicas mais sensíveis. Guerra *et al.*, (2003) documentaram um surto de LTA em 48 militares egressos de treinamento do exército na Amazônia brasileira. A pesquisa direta foi positiva em 43 (89,6%) dos acometidos, aproximando-se dos resultados obtidos neste trabalho. Furtado *et al.*, (1980) correlacionam que a probabilidade de encontrar o parasita é inversamente proporcional ao tempo de evolução da doença, ou seja, lesões mais antigas cursam com menor parasitismo. Nesta casuística de 33 doentes, o tempo máximo de doença foi de 6 meses, favorecendo uma alta sensibilidade. Deve-se enfatizar que os relatos na literatura abordam casos ocasionados por *Leishmania (V.) braziliensis*, faltando mais pesquisas que avaliem a sensibilidade da pesquisa direta nas outras espécies causadoras de LTA na Amazônia.

Na Amazônia brasileira, a LTA pode ser causada por sete espécies diferentes, incluindo a *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) naiffi*,

*Leishmania (V.) lindenbergi*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) lainsoni* e *Leishmania (L.) amazonensis* (SILVEIRA, 2008). Esta diversidade contribui para os diferentes achados encontrados na literatura quando se aborda a sensibilidade diagnóstica da pesquisa direta.

Nesta amostra de 33 doentes, somente foram encontradas 3 espécies do parasita: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (V.) shawi*. Devido ao pequeno número de casos estudados, não é possível afirmar que as outras espécies presentes na Amazônia não existam em Rondônia. Gontijo e Carvalho (2003) destacam a *Leishmania (V.) braziliensis* como principal espécie responsável pela LTA no país e Lainson *et al.*, (1987) enfatizam a *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) guyanensis* são as duas espécies mais comuns no Brasil. Nesta amostra dominou a presença da *Leishmania (V.) braziliensis* (72,7%), seguida da *Leishmania (V.) guyanensis* (24,3%) e *Leishmania (V.) shawi* (3,0%). Romero *et al.*, (2001a) afirmam que a *Leishmania (V.) guyanensis* é a espécie predominantemente associada à LCL ao norte do Rio Amazonas, achado que não foi repetido em Rondônia.

Silveira *et al.*, (2008) defendem que a LCL e a LCDB podem ser causadas pelos membros dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, e que as formas polares LCM e LCAD são originadas pela *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) amazonensis*, respectivamente. Também afirmam que as espécies *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) lindenbergi* e *Leishmania (V.) naiffi*, em ordem decrescente de infecção no homem, são agentes somente da LCL. Lessa *et al.*, (2007) relatam que a LCM pode apresentar como etiologia a *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) panamensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. No entanto, tem-se observado no estado de Rondônia, casos de LCM gerados por *Leishmania (V.) guyanensis*, extrapolando a generalização de sua associação causal apenas com a LCL. De acordo com os resultados observados na maioria dos estudos no Brasil, a *Leishmania (V.) braziliensis* destacou-se como principal agente etiológico da LCL.

Romero *et al.*, (2001b) afirmam que as úlceras por *Leishmania (V.) guyanensis* são menores e mais numerosas do que as ocasionadas pela *Leishmania (V.) braziliensis*, discordando dos resultados do atual trabalho realizado em Rondônia, onde as cepas de *Leishmania (V.) braziliensis* cursaram com úlceras menores do que 2,5 cm em 15 (62,5%) pacientes e as cepas de *Leishmania (V.) guyanensis* em 3 (37,5%) doentes. Uma possível

justificativa reside na questão de que os dados de Romero *et al.*, (2001a) foram provenientes de 2 regiões brasileiras distintas e geograficamente distantes, ou seja, a amostra de *Leishmania (V.) braziliensis* foi coletada na Bahia e a de *Leishmania (V.) guyanensis* foi oriunda de Manaus.

Pereira *et al.*, (2013) realizaram uma pesquisa em 48 portadores de LTA, sendo que 40 amostras eram provenientes do estado do Rio de Janeiro e 8 da região Amazônica. Todas as amostras do Sudeste brasileiro não estavam infectadas pelo LRV-1 e 2 (25%) das 8 amostras amazônicas estavam infectadas. Estas 2 amostras cursaram com reativação das lesões após a cura clínica. Hartley *et al.*, (2012) apontam que a presença do LRV-1 favorece a persistência da *Leishmania*, e quanto maior for a duração da doença, maior é o risco de disseminação para mucosas. Ogg *et al.*, (2003) trabalharam, em Minas Gerais, com 47 amostras de LTA em diferentes estágios evolutivos da doença, detectando 12 (25,5%) infectados pelo LRV-1. Saiz *et al.*, (1998) diagnosticaram a positividade para o LRV-1 em 2 (18%) de 11 amostras. Nestes 3 estudos, o percentual de positividade para o LRV-1 aproxima-se dos resultados coletados em Rondônia, que constatou 8 (24,2%) infectados pelo LRV-1.

Zanger *et al.*, (2013) registram que o LRV-1 tem sido detectado em amostras mucosas de humanos e hamsters, porém seu achado é escasso ou raro na forma cutânea. Concorde-se que o encontro do LRV-1 seja alto na LCM, porém na casuística deste estudo, o LRV-1 foi diagnosticado em quase 25% das amostras, não sendo tão raro conforme descrito. Esta diferença deve resultar de variações geográficas. Embasando esta variação pode-se citar um estudo que foi realizado no estado do Rio de Janeiro por Pereira *et al.*, (2013), onde as cepas de *Leishmania* que ocasionavam LCM não estavam infectadas pelo LRV-1.

Convencionou-se que o grupo A seria composto por doentes com positividade para a presença do LRV-1 e que o grupo B seria composto por doentes não infectados pelo LRV-1. O grupo A incluiu 8 e o grupo B 25 pacientes. Em relação às associações clínicas e sócio-demográficas, observou-se que todos os representantes do grupo A eram todos do sexo masculino e que no grupo B havia 20 (80%). Guerra *et al.*, (2011a) afirmam que o sexo masculino tende a desenvolver as formas mais graves da doença. Faucher *et al.*, (2011), em um trabalho com LCM gerada por *Leishmania (L.) infantum*, suspeitam que fatores hormonais possam favorecer a ocorrência da doença no sexo masculino, conferindo uma parcial proteção no sexo feminino. Fato interessante foi a ocorrência da endossimbiose *leishmania*-LRV-1 se

instalar exclusivamente no sexo masculino, porém Ogg *et al.*, (2003), em sua casuística de 47 casos, encontraram 3 pacientes do sexo feminino infectadas pelo LRV-1. Pelo fato de ter havido destaque da transmissão extradomiciliar da LTA, deve-se considerar a influência da prevalência do sexo masculino relacionada ao trabalho rural. Outra possível justificativa para esta tendência reside na não associação dos casos estudados com a transmissão domiciliar, uma vez que a domiciliação da LTA aumenta a prevalência do acometimento em mulheres e crianças.

Houve maior risco de coinfeção pelo LRV-1 com a faixa etária abaixo de 20 anos e acima de 49 anos ( $p=0,01$ ). Notou-se que no grupo A predominaram os extremos de idade, abaixo de 20 anos e acima de 50 anos, perfazendo 7 casos (87,5%). Ogg *et al.*, (2003) isolaram o LRV-1 em 12 amostras, nas quais a faixa etária variou entre 4 e 75 anos, com média de 46,5 ( $\pm 25,0$ ) anos de idade, destacando-se os casos abaixo de 20 anos e acima de 50 anos, somando 9 (75%) doentes e aproximando dos resultados obtidos em Rondônia. Ao contrário, no grupo B destacou-se a faixa etária entre 20 a 50 anos, constituindo 76% do total de indivíduos. Castro *et al.*, (2002), em uma análise de 332 casos de LTA, computaram que 70,9% dos pacientes se encontravam entre 15 a 49 anos de idade. Assim, o grupo B aproximou-se mais da estatística geral da maioria dos estudos em LTA. Estudos que analisam a associação do LRV1 com dados clínicos e sócio demográficos são poucos e superficiais, havendo, até o momento, grande restrição no entendimento deste assunto.

Em ambos os grupos, a procedência rural ou da capital foi próxima, de modo que o grupo A apresentou 62,5% no meio rural e o grupo B 68%. Estes percentuais traduzem a predominância da LTA no meio rural, mas mesmo os casos oriundos da capital exerceram atividade florestal no tempo que antecedeu a ocorrência das úlceras.

Quanto ao número de lesões, 62,5% dos indivíduos do grupo A evoluíram com mais de 1 úlcera, divergindo do grupo B, onde apenas 32% cursaram com mais de 1 úlcera, porém não houve risco significativo com o número de úlceras ( $p=0,21$ ). Fato semelhante se deu em relação ao diâmetro, onde o diâmetro maior do que 2,5cm foi encontrado em 75% dos pacientes do grupo A e em apenas 36% no grupo B. Ronet *et al.*, (2011) defendem que pacientes parasitados por cepas de *Leishmania (V.) guyanensis* infectadas pelo LRV-1 produzem maiores níveis de TNF  $\alpha$ . Oliveira *et al.*, (2011) detectaram associação estatisticamente significativa entre altos níveis de TNF  $\alpha$  e o diâmetro da úlcera cutânea.

Deste modo, é possível o encontro de úlceras maiores no grupo de portadores do LRV-1, conforme demonstrado na estatística deste trabalho. Ives *et al.*, (2011) defendem a teoria de que logo após a inoculação de amastigotas no tecido do hospedeiro, já ocorre a morte de algumas cepas de *Leishmania*, liberando RNA viral do LRV-1, que estimula precocemente a resposta inflamatória no organismo parasitado, piorando o prognóstico da doença. Este grupo também define que cepas metastáticas de hamsters e de seres humanos com LCM são infectadas pelo LRV-1, ao contrário das cepas não metastáticas. Além disto, a presença do LRV-1 subverte a resposta imune do hospedeiro, promovendo persistência parasitária e maior atividade da doença, fato este demonstrado pelo maior edema observado no coxim plantar de ratos inoculados com cepas de *Leishmania* infectadas pelo LRV-1. Tarr *et al.*, (1988) reportam que isolaram o LRV1 de uma lesão cutânea de um paciente que visitou o Suriname. Este paciente evoluiu com lesões satélites e acometimento linfático, e quando o isolado foi inoculado em um hamster, o mesmo complicou com lesões mucosas. É possível que esta estimulação imunológica precoce já influencie o quadro clínico e evolução da LTA em sua manifestação cutânea inicial, induzindo formas de LCL mais disseminadas e com maior diâmetro. Baseado no princípio de que lesões maiores e mais numerosas de LCL complicam mais com LCM, especula-se que a participação do LRV-1 interaja no sentido de favorecer a ocorrência de complicações mucosas.

O grupo A cursou com 5 (62,5%) lesões acima da cintura pélvica e 3 (37,5%) em outras localizações. Já o grupo B cursou com 12 (48,0%) acima da cintura pélvica e 13 (52%) em outras localizações. No grupo A foram mais comuns as lesões acima da metade superior do corpo e no grupo B abaixo, porém não houve risco significativo ( $p=0,48$ ). Lesões acima da cintura pélvica correm maior risco de evoluírem para LCM, porém o mecanismo não está completamente esclarecido na literatura.

A adenomegalia foi achada comum nos dois grupos, de modo que no grupo A ocorreu em 5 (62,5%) e no grupo B em 15 (60%), não havendo diferenças de acometimento nos dois grupos.

Scheffter *et al.*, (1995) referem que o LRV-1 pode infectar cepas do subgênero *Viannia*, estando de acordo com os achados deste estudo, no qual o LRV-1 foi encontrado em 6 *Leishmania (V.) braziliensis* e em 2 *Leishmania (V.) guyanensis*, representando 25% em ambas as espécies. O único caso de *Leishmania (V.) shawi* não se encontrava infectada pelo

LRV-1. Saiz *et al.*, (1998) afirmam que o LRV-1 pode ser detectado em amostras de biópsias de pacientes com LTA no Peru, infectando a *Leishmania (V.) braziliensis* e a *Leishmania (V.) guyanensis*. A partir deste estudo de Saiz, constatou-se que o LRV-1 não era um artefato laboratorial, podendo ser encontrado em amostras teciduais de pacientes com LTA. Ogg *et al.*, (2003) referem que a *Leishmania* encontra-se persistentemente infectada pelo LRV-1, inclusive após a cicatrização das lesões, onde foi encontrada positividade para o LRV-1. Assim, é possível que o LRV1 possa atuar como fator estimulador da resposta imune a longo prazo, favorecendo a ocorrência da LCM.

Uma das limitações deste estudo foi a não quantificação do número de cópias do LRV-1, pois Ronet *et al.*, (2011) afirmam que cepas de *Leishmania* infectadas por uma quantidade maior do vírus ativam mais eficientemente a resposta inflamatória.

Este é o primeiro estudo que associa a presença do LRV-1 com as características clínicas da LTA em sua forma cutânea pura, contribuindo para um melhor entendimento da participação deste vírus na etiopatogenia da LTA. Um acompanhamento a longo prazo será essencial para avaliar se o grupo de pacientes infectados com o LRV-1 apresentará um desfecho clínico diferente em relação aos não infectados. Mesmo que a participação do LRV-1 seja comprovada com significância estatística em estudos futuros, este fato não exclui a influência de outros potentes fatores ligados ao hospedeiro e à *Leishmania*. Na amostra estudada, apesar de ter havido um maior risco somente com a faixa etária abaixo de 20 e acima de 49 anos ( $p=0,01$ ), descreve-se, nas amostras coinfectadas pelo LRV-1, uma tendência a lesões múltiplas, localizadas acima da cintura pélvica e com diâmetro acima de 2,5 cm.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Na casuística desta pesquisa, o LRV-1 coinfecta 24,2% das amostras de LTA em sua forma cutânea.

As espécies coinfectadas pelo LRV-1 foram *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) guyanensis*.

Apesar de ter tido significância estatística apenas com o grupo abaixo de 20 e acima de 49 anos de idade, descritivamente, a presença do LRV-1 influenciou a ocorrência de lesões

múltiplas, localizadas acima da cintura pélvica e com diâmetro acima de 2,5 cm. Destaca-se que este comportamento não se deu no grupo de não coinfetados, onde predominou o inverso, ou seja, a faixa etária entre 20 a 49 anos. Esta classificação arbitrária dos grupos etários foi baseada em incluir o faixa etária entre 20 a 49 anos, que é a mais acometida, comparando-a com o grupo dos menos acometidos.

Foram identificadas 3 espécies causadoras da LTA em Rondônia: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (V.) shawi*, o que não exclui a possibilidade de existência de outras espécies de *Leishmania*.

A *Leishmania (V.) braziliensis* é a espécie mais encontrada na casuística desta pesquisa.

No grupo de não coinfetados pelo LRV-1, destacaram-se: lesão única, não localizada acima da cintura pélvica e diâmetro menor do que 2,5 cm.

Em ambos os grupos, infectados e não infectados pelo LRV-1, a adenomegalia teve incidência semelhante.

Entender o processo metastático e as inter-relações do parasita com o hospedeiro ajuda a prever o prognóstico da doença, e uma melhor compreensão da participação do LRV-1 na etiopatogenia da LTA trará maiores avanços na capacidade preditora de prognóstico desta importante doença tropical.

## REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOU, L.A.C; HOLT, R; MEDZHITOV R. A; FLAVELL. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. **Nature**. p.732-738. 2001.
- AMEEN, M. Cutaneous *leishmaniasis*: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and experimental dermatology**, Nova York, v.35, n.7, p.699-705. 2010.
- ANDRADE, S.L. **Leishmaniose tegumentar americana em área de ocupação recente na periferia da Cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil**. Dissertação de Mestrado – Departamento de Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1997.
- ARAGÃO, H. B. Leishmaniose tegumentar e sua transmissão pelos phlebótomos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 20, p. 177-187. 1927.
- AYRES M.; AYRES JÚNIOR M.; AYRES D.L.; SANTOS A.A.S. **Bioestat – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biomédicas**. 5ª Edição. Belém: Mamirauá; 2007.
- BAFICA A; OLIVEIRA F; FREITAS L.A; NASCIMENTO E.G; BARRAL A. American cutaneous *leishmaniasis* unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. **International Journal of Dermatology**. 42: 203 – 207. 2003.
- BARRAL A; BARRAL-NETTO M; ALMEIDA R; DE JESUS A.R; GRIMALDI JÚNIOR G; NETTO E.M; SANTOS I; BACELLAR O; CARVALHO E.M. "Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection", **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 47, p.587-592. 1992.
- BARRAL A; GUERREIRO J; BOMFIM G; CORREIA D; BARRAL-NETTO M; CARVALHO EM. "Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*", **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 53, p.256-259. 1995.
- BASANO,S. A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Epidemiologia**. 7(3):328-337. 2004.
- BATISTA, R. S. Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias. Capítulo 2: Doenças causadas por protozoários. Rio de Janeiro: **Cultura Médica**, 2v. 2001.
- BELKAID Y; MENDEZ S; LIRA R; KADAMBI N; MILON G; SACKS D. A natural model of *Leishmania* major infection reveals a prolonged silent phase of parasite amplification in the

skin before the onset of lesion formation and immunity. **The Journal of Immunology**. 165: 969–977. 2000.

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

BRANDÃO FILHO S; CAMPBELL-LENDRUM D; BRITO MEF; SHAW JJ; DAVIES CR. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous *leishmaniasis* in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 93:488-94. 1999.

BRASIL, DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO - Ministério da Saúde. República Federativa do Brasil. **Imprensa Nacional**. Portaria nº 59, de 28 de janeiro de 2003, Brasília-DF, Edição Número 22 de 30/01/2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 124 p. 2006.

BRASIL. SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial**. 1ª edição. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília – DF 2006.

BRASIL. SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília; Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2.ª edição atualizada 1.ª reimpressão. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília – DF 2010.

BRASIL, **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília : Ministério da Saúde, p.9. 2011.

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

CAMARGO, LB; LANGONI, H. Impact of *leishmaniasis* on public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. V. 12, p. 527-548. 2006.

CANTANHÊDE, Lilian Motta. **Deteção de *Leishmaniavírus* em amostras de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos no Centro de Medicina Tropical**

**de Rondônia- CEMETRON.** Dissertação (Programa de pós-graduação em Biologia Experimental) Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho. 2013

CASQUEIRO, Juliana Borges. **Estudo Comparativo entre o Antimoniato-N-Metilglucamina (Glucantime+15) e o isotionato de pentaminida em lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar.** Trabalho de Conclusão de Curso. Medicina. Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2012.

CASTRO E.A; SOCCOL V; MEMBRIVE N; LUZ E. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** Rio de Janeiro, v. 35, n. 5, p. 445-452, 2002.

CATORZE M.G.B. Leishmaniose e SIDA. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana.** Voume 33, número: 6:237-250. 2005.

COELHO NETO, G.T; RODRIGUES, F.M.D; MENEZES, JGPB; GAMA, MEA; GONÇALVES, EGR; SILVA, AR; LAURENTI, MD; SILVEIRA, FT; CORBETT, CEP; GOMES, CMC. Estudo epidemiológico de pacientes com Leishmaniose tegumentar americana em Buriticupu, pré-Amazônia Maranhense. **Revista Ciência e Saúde.** V.14, n.2, p133-138. 2012.

COSTA JML; SALDANHA ACR; NASCIENTO D; SAMPAIO G; CARNEIRO F; LISBOA E. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia.** 79 (Supl. 3):70-83. 2009.

DA GRAÇA, CG; VOLPINI, AC; ROMERO, GAS; OLIVEIRA-NETO, MP; HUEB, M; PORROZZI, R; BOITÉ, MC; CUPOLILLO, E. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous *leishmaniasis* and identification of the parasite species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v. 107(5), p. 664-674. 2012.

DEAN A.G; DEAN J.A; COULOMBIER D. Epi Info, Version 6: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. **Centers of Disease Control and Prevention,** Atlanta, Georgia, USA, 1994.

FAUCHER, B; POMARES, C; FOURCADE S; BENYAMINE, A; MARTY, P; PRATLONG, L; FARAUT, F; MARY, C; PIARROUX, R; DEDET, JP; PRATLONG, F. Mucosal *Leishmania infantum* leishmaniasis: specific pattern in a multicentre survey and historical cases. **The Journal of Infection.** vol. 63, no. 1, pp. 76–82, 2011.

FORATTINI O.P. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** v. 2:p. 195-203. 1960.

FURTADO T. Critérios para diagnóstico de LTA. **Anais Brasileiros de Dermatologia** 65: 51-86, 1980.

GONTIJO, Bernardo. **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.** (Tese de Doutorado) Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Minas Gerais, Espírito Santo, 91p, 1997.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** Uberaba, v. 36, n. 1, Jan. 2003.

GUERRA JAO; TALHARI S; PAES MG; GARRIDO M; TALHARI JM. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36: 587-590, 2003.

GUERRA, J.A.O.; BARBOSA, M.G.V.; LOUREIRO, A.C.S.P.; COELHO, C.P.; ROSA, G.G.; COELHO, L.I.A.R.C. American tegumentary *leishmaniasis* in children: epidemiological aspects of cases treated in Manaus, Amazonas, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, 23: 2215-2223. 2007.

GUERRA J.A.; PRESTES S.R; SILVEIRA H.; COELHO L.I; GAMA P.; MOURA A.; AMATO V.; BARBOSA M.G.; FERREIRA L.C. Mucosal *leishmaniasis* caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected and Tropical Disease** 5: e980. 2011a.

GUERRA, JAO; COELHO, LIRC; PEREIRA FR. American tegumentary *leishmaniasis* and HIV-AIDS association in a tertiary care center in the Brazilian Amazon. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** vol. 85, no. 3, pp. 524–527, 2011b.

GUILBRIDE, L.; MYLER, P. J. & STUART, K. Distribution and sequence divergence of *lrv1* viruses among different *leishmania* species. **Molecular Biochemical Parasitology.** 54, 101-104. 1992

GUIMARÃES L.H; MACHADO P.R.L.A; LESSA H.A; ARGEMIRO OLIVEIRA JR; CARVALHO E.M. Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar. **Gazeta Médica da Bahia.** 75:66-74. 2005.

GUPTA V; DEEP A. An insight into the *Leishmania* RNA virus. **Indian Journal Med Microbiology** ;25:7-9. 2007.

HARTLEY M.A.; RNET C.; ZANGGER H.; BEVERLEY S.M.; FASEL N. *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.** 2: 99. 2012.

HOARE C.A; WALLACE F.C. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology. **Nature.** 212: 1358-1996, 1966.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=110020&idtema=1&search=rondonia|porto-velho|censo-demografico-2010:-sinopse->. Acesso em 15-02-2013.

IVES A; RONET C; PREVEL F; RUZZANTE G; Fuertes-Marraco S; Schutz F; Zangger H; Revaz-Breton M; Lye LF; Hickerson SM; Beverley SM; Acha-Orbea H; Launois P; Fasel N; Masina S. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous *leishmaniasis*. **Science**. 331: 775-778. 2011.

JONES TC; JOHNSON WD; BARRETO AC; LAGO E; BADARÓ R; CERF B; REED SG; NETO EM; TADA MS; FRANÇA F; WIESE K; GOLIGHTLY L; FIKRIG E; COSTA JML; CUBA CC; MARSDEN PD. Epidemiology of American cutaneous *leishmaniasis* due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **The Journal of Infectious Diseases**. 156:73-83. 1987.

KAYE, P; SCOTT, P. *Leishmaniasis*: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**. v. 9, p. 604–615. 2011.

LAINSON R; STRANGWAYS-DIXON J. The epidemiology of dermal *leishmaniasis* in British Honduras. Part II. Reservoir-hosts of *Leishmania mexicana* among the forest rodents. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 58:136-53. 1964.

LAINSON R; SHAW JJ. Some reservoir-hosts of *Leishmania* in wild animals of Mato Grosso State, Brazil. Two distinct strains of parasites isolated from man and rodents. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 63(3):408-9. 1969.

LAINSON, R.; SHAW J.J. Epidemiology and ecology of *leishmaniasis* in Latin-America. **Nature** (S.1),p. 273,p.595-600, 1978.

LAINSON, R. The american lishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. (S.1),v.77,p 569-596, 1983.

LAINSON, R; SHAW, J.J. Evolution classification and geographical distribution of *Leishmania*. In: Peters W, Killik-Kendrick R, eds. **The leishmaniasis in biology and epidemiology**. Vol 1. London: Academic Press, 1–120. 1987.

LAINSON, R, SHAW J.J; SILVEIRA, F.T; SOUZA, A.A.A; BRAGA, R.R; ISHIKAWA, E.A.I. The dermal *leishmaniasis* of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 89: 435-43, 1994.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. vol.1, no.2, p.13-32. ISSN 2176-6223. 2010.

LEMOS JC; LIMA SC; COSTA MB; MAGALHÃES MJ. Leishmaniose Tegumentar Americana: Fauna flebotomínica em áreas de transmissão no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Caminhos de Geografia**. 2:57-73. 2001.

LESSA, M.M; LESSA, H.A; CASTROT.W.N; OLIVEIRA, A; SCHERIFER, A; MACHADO, P; CARVALHO, E.M. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. São Paulo, v. 73, n. 6, Dec. 2007.

LIMA EB; PORTO C; MOTTA JCO; SAMPAIO RNR. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais da Sociedade Brasileira de Dermatologia**. 82:111-24. 2007.

LINDENBERG A. L'ulcere de Bauru ou le bouton d'orient au Brésil. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**. 2:252-4. 1909.

LLANOS-CUENTAS EA. **Estudo clínico evolutivo da leishmaniose em área endêmica de *L. braziliensis braziliensis***. Dissertação de mestrado. Brasília (DF): 1984.

LÜHE M. Die im Blute schmarotzenden Protozoen und ihre nächsten Verwandten. In: Mense C, Barth IA, editors. **Hanbuch der Tropenkrankheiten**. p.203. 1906.

MACHADO P; ARAUJO C; DA SILVA A.T; ALMEIDA R.P; D'OLIVEIRA J.R A; BITTENCOURT A; CARVALHO E.M. Failure of early treatment of cutaneous *leishmaniasis* in preventing the development of an ulcer. **Clinical Infectious Diseases** 34(12):E69-73, 2002.

MACHADO, C.L; MARTINS, T.C; COLTURATO, I; LEITE, M.S; SIMIONE, A.J; SOUZA, M.P; MAUAD, M.A; COLTURATO, V.R. Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of a Brazilian center. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 51(6):309-324, 2009.

MAGALHAES, A.V; MORAES, M.A.P; RAICK, A.N; LLANOS CUENTAS, A; COSTA, J.M.L; CUBA, C.C; MARSDEN, P.D. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 3. Reação celular nos tecidos. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 28, n. 5, Oct. 1986.

MARSDEN PD. Mucosal *leishmaniasis* ("espundia", Escomel 1911). **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene**. 80:859-876. 1986.

MARZOCHI, M.C.A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**. (S.1.),v.63,p82-104, 1992.

MARZOCHI M.C.A; MARZOCHI K.B.F. Leishmanioses em áreas urbanas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.30, p.162-163,1997.

MARZOCHI, M.C.A.; SCHUBACH, A.; MARZOCHI, K.B.F. Leishmaniose tegumentar americana. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999.

MEDINA HSG. Estudos sobre leishmaniose. I. Primeiros casos de leishmaniose espontânea observados em cobaias. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**. 1:39-74. 1946.

MEDINA R; ROMERO J. *Leishmania* pifanoi n.sp. El agente causal de la *leishmaniasis* tegumentaria difusa. **Archives Venez Pat Tropical and Parasite**. 4:349-53. 1962.

MELO MN; MAYRINK W; COSTA C; MAGALHÃES PA; DIAS M; WILLIAMS P; ARAÚJO FG; COELHO; BATISTA SM. Padronização do antígeno de Montenegro. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 6:171-176, 1977.

MENDONÇA, S.C; SOUZA, W.J; NUNES, M.P; MARZOCHI, M.C; COUTINHO, S.G. Indirect immunofluorescence test in New World *leishmaniasis*: serological and clinical relationship. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. (S.1.),v. 83,p.347-355, 1988.

MENDONÇA MG; BRITO MEF; RODRIGUES EHG; BANDEIRA V; JARDIM ML; ABATH FG. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous *leishmaniasis*: is there a sterile cure? **The Journal of Infectious Disease**. 189:1018-1023. 2004.

MILLER, J. H.; SCHWARTZWELTER, J. C. An electron microscopic study of *Entamoeba histolytica*. **Journal of Parasitology**. Vol. 46, 523-524. 1960.

MOLINET, Félix Javier León. **Desenvolvimento de uma regra de prognóstico para pacientes com leishmaniose cutânea localizada tratada com antimoniato de meglumina**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical) Universidade Federal de Brasília. Distrito Federal, 2013.

MONTENEGRO, J. A cútis-reação na leishmaniose. **Annais Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 1, p. 323:330, 1926.

NETTO, E.M; CUBA, C.C; COSTA, J.L.M; BARRETO, A.C; ROSA, C; MARSDEN P.D. Recurrence of South American tegumentary *leishmaniasis*. **Lancet**. (S.1), p.501, 1986.

OGG MM; CARRION R JR; BOTELHO AC; MAYRINK W; CORREA-OLIVEIRA R; PATTERSON JL. Short report: quantification of *leishmaniavirus* RNA in clinical samples and its possible role in pathogenesis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 69:309-13; PMID:14628949. 2003.

OLIVEIRA F; BAFICA A; ROSATO AB; FAVALI CB; COSTA JM; CAFE V; BARRAL-NETTO; BARRAL A. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous *leishmaniasis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 85:70-73. 2011.

PEREIRA, LOR; MARETTI-MIRA, AC; RODRIGUES, KM; LIMA, RB; OLIVEIRA-NETO, MP; CUPOLILLO, E; PIRMEZ, C; OLIVEIRA, MP. Severity of tegumentary *leishmaniasis* is not exclusively associated with *Leishmania* RNA virus 1 infection in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 108, n. 5. 2013.

PESSÔA SB. Classificação das leishmanioses e das espécies do gênero *Leishmania*. **Arquivos de Higiene e Saúde Pública.** p. 26:41-50. 1961.

PIZARRO P. Relación de la conquista del Peru. Colección de libros y documentos referentes a la historia del Perú. Vol VI ( 1st Series). Lima. **Collection Urteaga-Romero.**1571.

PUIG L; PRADINAUD R. *Leishmania* and HIV co-infection: dermatological manifestations. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology.** 97(1):107-14. 2003.

RABELLO, E. Formes cliniques de la leishmaniose tégumentaire. In: **CONGRÈS DES DERMATOLOGISTES ET SYPHILIGRAPHES DE LANGUE FRANÇAISE**, 12, 1923, Strasbourg. Strasbourg: [s.n.], 1923.

RAMÍREZ, JL; GUEVARA, P. Persistent Infections by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** p. 92(3), 333-338. 1997.

REED SG; ANDRADE ZA; ROTERS SB; INVERSO JÁ; SADIGURSKY M. *Leishmania mexicana amazonensis* infections in ‘resistant’ inbred mice following removal of the draining lymph node. **Clinical Experimental Immunology.** Vol. 64(1): 8-13.1986.

ROMERO GA; GUERRA MVF; PAES MG; MACÊDO VO. Comparison of Cutaneous *Leishmaniasis* due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. **Clinical Infectious Diseases.** 32:1304-12. 2001a.

ROMERO GA; GUERRA MV; PAES MG; MACEDO VO. Comparison of cutaneous *leishmaniasis* due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 65:456-465. 2001b.

RONET C; BEVERLEY S.M; FASEL N. Muco-cutaneous *leishmaniasis* in the New World The ultimate subversion Virulence 2:6, 547-552. **Landes Bioscience.** 2011.

ROSA, Maria Elisa Alves. **Aspectos Epidemiológicos, Clínicos, Imunológicos e Terapêuticos da Leishmaniose Disseminada produzida por *Leishmania braziliensis*.** 2012. Tese (Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

ROYSTON P, MOONS KG, ALTMAN DG, VERGOUWE Y. Prognosis and prognostic research: Developing a prognostic model. **British Medical Journal.** 338: b604. doi: 10.1136/bmj.b604. 2009.

SABROZA PC. **O domicílio como fator de risco na leishmaniose tegumentar americana. Estudo epidemiológico em Jacarepaguá, Município do Rio de Janeiro.** Tese da Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 1981.

SAF'IANOVA,V.M. Classification of the genus *Leishmania* Viannia Ross: in the *leishmaniasis*. Protozoology, v.1. Leningrado: **Academy of Science**, 1982.

SAIZ M; LLANOS-CUENTAS A; ECHEVARRIA J; RONCAL N; CRUZ M; MUNIZ MT; LUCAS C; WIRTH DF; SCHEFFTER S; MAGILL AJ; PATTERSON JL. Short report: detection of *leishmania* virus in human biopsy samples of *leishmaniasis* from Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 58: 192-194. 1998.

SALINAS G, ZAMORA M, STUART K, SARAVIA N. *Leishmania* RNA viruses in *Leishmania* of the Viannia subgenus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 54: 425-429. 1996.

SAMPAIO SAP; RIVITTI EA. **Dermatologia**. 3.ed. São Paulo: Artes Médicas. p.755-64. 2008.

SCHEFFTER SM; RO YT; CHUNG IK; PATTERSON JL. The complete sequence of *Leishmania* RNA virus LRV2-1, a virus of an Old World parasite strain. **Virology**. 212: 84-90. 1995.

SHAW J.J, LAINSON R. *Leishmaniasis* in Brazil: X. Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous *leishmaniasis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. vol 69:323-335, 1975.

SHARMA, U; SINGH, S. Immunobiology of *leishmaniasis*. **Indian Journal of Experimental Biology**. 47(6):412-23 ,2009.

SILVA L; COSTA HO; DUPRAT AC; BAIRÃO F; DELLA NINA M. Granulomatose laríngea. Avaliação e métodos diagnósticos e terapêuticos em 24 casos. **Acta Orl/ Técnicas em Otorrinolaringologia**. 25(1):16-23. 2007.

SILVA, O. D. Sobre a leishmaniose tegumentar e seu tratamento. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. [S. l.], v. 7, p. 213-248, 1915.

SILVEIRA, T.G.V.; ARRAES, S.M.A.A; BERTOLINI, D.A; TEODORO, U; LONARDONI, M.V.C; ROBERTO, A.C.B.S; RAMOS, M; SOBRINHO, A.N; ISHIKAWA, E; SHAW, J. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Paraná, Sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.32, p.413-423, 1999.

SILVEIRA, F. T; LAINSON, R; CORBETT, C.E.P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous *leishmaniasis* with special reference to the disease in

Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro , v. 99, n. 3, May 2004 .

SILVEIRA, F.T; MÜLLER, S.R; SOUZA, A.A.A; LAINSON, R; GOMES, C.M.C; LAURENTI, M.D; CORBETT, C.E.P. Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista de Parasitologia Médica**. Vol. 22(1):9-20. 2008.

SILVEIRA, F.T., Leishmaniose cutânea difusa (LCD) na Amazônia, Brasil: Aspectos clínicos e epidemiológicos. **Gazeta Médica da Bahia**. Vol. 79 (Supl.3):25-29. 2009.

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

Special Programme for Research and Training in Tropical Disease. Report on leishmaniasis. Geneva: **World Health Organization**. (Scientific Working Group). 2004.

STUART, K. D; WEEKS, R; GUILBRIDE, L; MYLER, P. J. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA 89, 8596-8600. 1992.

STRAZZULLA A; COCUZZA S; PINZONE MR. Mucosal *Leishmaniasis*: An Underestimated Presentation of a Neglected Disease. **BioMed Research International**, vol. Article ID 805108, 7 pages, 2013. doi:10.1155/2013/805108. 2013.

TARR P.I.; ALINE R.F.; SMILEY B.L.;SCHOLLER J.; KEITHLY J.; STUART K. LR1: a candidate RNA virus of *Leishmania*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 85: 9572-9575. 1988.

TURETZ ML; MACHADO PR; KO AI; ALVES F; BITTENCOURT A; ALMEIDA RP. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **The Journal of infectious diseases**. Vol.15;186(12):1829-34. 2002.

TRAVI B; REY-LADINO J; SARAVIA NG. Behavior of *Leishmania braziliensis* s.l. in golden hamsters: evolution of the infection under different experimental conditions. **Journal of Parasitology**. Vol. 74:1059-62; 186:1829-34. 1988.

VALE, E.C.S; FURTADO, T. Leishmaniose Tegumentar no Brasil: Revisão Histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais da Sociedade Brasileira de Dermatologia**. V. 80(4):421-8. 2005.

Velez I.R. Uta et espundia. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**. vol. 6:545. 1913.

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota preliminar). **Brasil Médico**. S. l.], v. 25, p. 411, 1911.

VIANNA, G. O. **Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético**. Anais do 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia. vol. 4, 426. 1912.

VIANNA, D. Sobre o tratamento da leishmaniose tegumentar. **Annais Paulistas de Medicina e Cirurgia**, [S. l.], v. 2, p. 167-169, 1914.

VON STEBUT E. Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. **Experimental Dermatology**. Apr;16 (4):340-6. 2007.

WALTERS, L.L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. **Journal Eukaryotic Microbiology**, 40: 196-206. 1993.

WANG, A. L.; WANG, C. C. **Molecular and Biochemical Parasitology**. Vol. 21, 269-276. 1986.

WEIGLE K.A; DE DAVALOS M; HEREDIA P; MOLINEROS R; SARAIVIA N.G. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous *leishmaniasis* in Colombia: a comparison of seven methods. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. vol 36: 489–496. 1987.

WIDMER G; DOOLEY S. Phylogenetic analysis of *Leishmania* RNA virus and *Leishmania* suggests ancient virus-parasite association. **Nucleic Acids Research**. 23: 2300-2304. 1995.

World Health Organization (WHO). **Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of *Leishmaniases***. Geneva, 22–26 March; 2010.

WRIGHT JH. Protozoa in a case of tropical ulcer ("Delhi sore"). **The Journal of Medical Research**. Dec;10(3):472-82. 1903.

ZANGGER, H; RNET, C; DESPONDS, C; KUHLMANN, F.M; ROBINSON, J; HARTLEY, M.A; PREVEL, F; CASTIGLIONI, P; PRATLONG, F; BASTIEN, P; MÜLLER, N; PARMENTIER, N; SARAIVIA, N.G; BEVERLEY, S.M; FASEL, N. Detection of *Leishmania* RNA virus in *Leishmania* parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. vol. 7, no. 1. 2013.

APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução CNS nº196, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, de 10/10/96)

**VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO (A) COMO VOLUNTÁRIO (A) A PARTICIPAR DA PESQUISA:**

**CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE *LEISHMANIA* RNA VÍRUS (LRV) E AS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM RONDÔNIA.**

**I) JUSTIFICATIVA:** A leishmaniose tegumentar, conhecida popularmente como ferida-brava é uma infecção de manifestação cutânea apresentando feridas indolores na pele e/ou mucosas (boca, nariz) do paciente. É uma doença transmitida pela picada do mosquito infectado e tem maior ocorrência em áreas rurais, próximas a florestas, e é considerada um problema de saúde pública mundial pela Organização Mundial de Saúde. Em todas as regiões brasileiras, a leishmaniose está presente, sendo a Região Norte responsável pela maior parte dos casos. Alguns pacientes que trataram a leishmaniose cutânea, anos após cura aparente das feridas, apresentam uma forma mais grave da doença que atinge as mucosas. Os motivos que levam ao aparecimento dessas lesões não são totalmente esclarecidos. Um estudo recente sugere que um vírus que infecta a *Leishmania*, conhecido como *Leishmaniavirus* (LRV1) pode estar relacionado com esse agravo. Até o momento, não existem dados do *Leishmaniavirus* na América do Sul. Um número maior de casos deve ser pesquisado para avaliar a hipótese de que a presença do vírus está associada com o desenvolvimento subsequente de leishmaniose mucosa, e se confirmada a hipótese, os pacientes infectados com o *Leishmaniavirus* poderão ser tratados de forma específica para prevenir o desenvolvimento da leishmaniose mucosa.

**II) OBJETIVO:** Determinar se o *Leishmaniavirus* (LRV1) ocorre em pacientes atendidos no ambulatório do Centro de Medicina Tropical (CEMETRON) e averiguar se existe uma possível relação entre a presença do vírus e a progressão para a forma mucocutânea da doença.

**III) PROCEDIMENTOS:** Após o aceite do voluntário em participar da pesquisa, este receberá o TCLE e os esclarecimentos sobre a pesquisa. Serão coletadas secreções das lesões suspeitas de Leishmaniose. As lesões que apresentarem perfil característico para o estudo, poderão ser fotografadas, podendo o voluntário limitar-se a fornecer somente as amostras. Não haverá desconforto, uma vez que a coleta do material secretado das lesões será realizado com um swab asséptico e não cortante. O material biológico coletado será armazenado de maneira confidencial e segura no laboratório do IPEPATRO( R. Da Beira, 7671 - BR 360, Km 3,5 - Lagoa - Porto Velho, Rondônia - BrasilFone/Fax: (69) 3219-6000),de modo que o mesmo será descartado ao final de 1 ano ou a qualquer momento, à pedido do voluntário . Não haverá mudança da proposta terapêutico preconizada pelo Ministério da Saúde na pesquisa, deste modo não há riscos previsíveis e nem haverá procedimento alternativo ao da pesquisa, uma vez que não haverá mudança de protocolos. Tal pesquisa visa contribuir para um melhor entendimento dos fatores que influenciam a ocorrência da Leishmaniose mucosa, trazendo benefícios coletivos, uma vez que há 12 milhões de infectados no mundo.

**GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:**

Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O(s) pesquisador (es) irá (ao) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados dos testes que serão realizados dentro de laboratório de pesquisa serão guardados e enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desse estudo. Uma cópia NÚMERO DO PACIENTE deste consentimento informado será arquivada na Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ RO e outra será fornecida a você.

**FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:** O voluntário será acompanhado no ambulatório de Dermatologia no CEMETRON pelo profissional Cipriano Ferreira da Silva Júnior, desde o diagnóstico até o final do tratamento endovenoso com Glucantime, que terá duração entre 20 a 30 dias contínuos, administrados de maneira ambulatorial no CEMETRON. Em seguida será acompanhado mensalmente durante 1 ano ou até ser considerado definitivamente curado. Não haverá grupo placebo ou de controle, ou seja, grupo que não receberá medicação ou terá seu tratamento desviado do padrão. Todos receberão igual tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde.

**CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS:**

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional, uma vez que não será alterado o protocolo padrão de diagnóstico e tratamento do Ministério da Saúde.

**DECLARAÇÃO DO (A) PARTICIPANTE (A) OU DO SEU RESPONSÁVEL:**

Eu, \_\_\_\_\_, fui informada (o) dos objetivos da pesquisa acima, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. Os Professores Ricardo de Godoi Mattos Ferreira, Juan Miguel Villalobos Salcedo e Cipriano Ferreira da Silva Júnior certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar a **estudante Lilian Motta Cantanhêde, Cipriano Ferreira da Silva Júnior e os professores Ricardo de Godoi Mattos Ferreira e/ou Juan Miguel Villalobos Salcedo, nos telefones (69) 3219 6008, (69) 3219 6003, (69) 8113 3308 ou nos e-mails licantanhede@gmail.com , ricardogodoi@fiocruz.com e drciprianoferreira@hotmail.com.**

Os pesquisadores desta pesquisa me informaram que o projeto foi aprovado pelo Comitê de ética e pesquisa em seres humanos do CEPEM (Av. Guaporé,415, Lagoa, Porto Velho - Rondônia).

Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Assinatura do Voluntário

---

Assinatura dos Pesquisadores Responsáveis

**Pesquisadores Responsáveis:**

Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira

Vice-diretor de Gestão e Desenvolvimento Institucional Fiocruz Rondônia. BR 364, Km 3,5, Lagoa - Porto Velho - RO

Cipriano Ferreira da Silva Júnior e Juan Miguel Villalobos Salcedo  
Av. Presidente Dutra, 2965 – Centro. CEP: 76801-974 - Porto Velho – RO  
Fone:(69) 2182-2000

**Comitê de ética e pesquisa (CEP)**

MSc. Flávia Serrano Batista Coordenadora

Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) Av.Guaporé, 415, Lagoa, Porto Velho –Rondônia.

**APÊNDICE B: FORMULÁRIO PESQUISA SOBRE LEISMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

<b>UNIDADE</b>	<b>CEMETRON</b>
<b>NÚMERO DO REGISTRO</b>	
<b>ENDEREÇO E TELEFONE</b>	

**IDENTIFICAÇÃO:**

<b>NOME</b>	
<b>IDADE</b>	
<b>SEXO</b>	
<b>PROFISSÃO</b>	
<b>NATURALIDADE</b>	
<b>PROCEDÊNCIA</b>	
<b>ÚLTIMA RESIDÊNCIA</b>	
<b>VIAGEM AO EXTERIOR</b>	

**ANTECEDENTES:**

<b>CONTATO COM FLORESTAS</b>	
<b>LTA PRÉVIA</b>	
<b>TRATAMENTO REALIZADO E COM O QUE?</b>	

<b>TRATAMENTO REGULAR</b>	
<b>TRATAMENTO IRREGULAR</b>	
<b>CURA CLÍNICA</b>	
<b>RECIDIVA</b>	
<b>TEMPO DE EVOLUÇÃO</b>	
<b>QUADRO CLÍNICO ATUAL:</b>	
<b>TEMPO DE EVOLUÇÃO:</b>	

<b>CARACTERÍSTICAS DA LESÃO:</b>	
<b>MAIOR DIÂMETRO</b>	
<b>NÚMERO E LOCALIZAÇÃO</b>	
<b>ADENOMEGALIA</b>	

<b>CONFIRMAÇÃO DIAGNÓSTICA ATUAL?</b> <b>MÉTODO?</b>	
---	--

## APÊNDICE C: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO CENTRO DE PESQUISA EM MEDICINA TROPICAL DE RONDÔNIA-CEPEM



 principal

Público
Pesquisador
Alterar Meus Dados

Cipriano Ferr

Você está em: [Pesquisador](#) > [Gerir Pesquisa](#) > [Detalhar Projeto de Pesquisa](#)

### DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

#### Dados do Projeto de Pesquisa

**Título da Pesquisa:** Correlação entre a presença de Leishmania RNA virus (LRV) e as diferentes formas clínicas da Leishmaniose tegumentar americana em Rondônia

**Pesquisador:** Juan Miguel Villalobos Salcedo

**Área Temática:** Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

**Versão:** 2

**CAAE:** 08463112.7.0000.0011

**Submetido em:** 08/02/2013

**Instituição Proponente:** Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM -Rondônia

**Situação:** Aprovado

**Localização atual do Projeto:** Pesquisador Responsável

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ NOROESTE

