



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DAS
RELAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO**

ROSANA PEREIRA MORAIS BALIAN

**Leishmaniose Tegumentar Americana na região Centro-
Oeste: avaliação de dados clínicos, epidemiológicos,
laboratoriais e moleculares.**

**Goiânia
2014**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Rosana Pereira Morais Balian		
E-mail:	rosanapm@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	☒ Sim	☐ Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Fundação de amparo à pesquisa do Estado de Goiás	Sigla:	FAPEG
País:	Brasil	UF: GO	CPF/CNPJ: 002.225.741-19
Título:	Leishmaniose Tegumentar Americana na região Centro-Oeste: avaliação de dados clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e moleculares.		
Palavras-chave:	LTA, Centro-Oeste, dados epidemiológicos, laboratoriais e moleculares		
Título em outra língua:	Cutaneous Leishmaniasis in the Midwest region: review of clinical, epidemiological, laboratory and molecular data.		
Palavras-chave em outra língua:	Cutaneous Leishmaniasis, Midwest, clinical, epidemiological, laboratory and molecular		
Área de concentração:	Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	30/04/2014		
Programa de Pós-Graduação:	Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro		
Orientador (a):	Miriam Leandro Dorta		
E-mail:	mledorta@gmail.com		
Co-orientador (a):*			
E-mail:			

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

 Data: ____ / ____ / ____

 Assinatura do (a) autor (a)

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

ROSANA PEREIRA MORAIS BALIAN

Leishmaniose Tegumentar Americana na região Centro-Oeste: avaliação de dados clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e moleculares.

Dissertação de Mestrado
apresentado ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia das Relações
Parasito-Hospedeiro da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do
Título de Mestre

Orientadora: Miriam Leandro Dorta

**Goiânia
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

B186l Balian, Rosana Pereira Moraes.
Leishmaniose Tegumentar Americana na região Centro-Oeste: avaliação de dados clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e moleculares [manuscrito] / Rosana Pereira Moraes Balian. - 2014.
xvi, 59 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Miriam Leandro Dorta
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical de Saúde Pública, 2014.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. Leishmaniose tegumentar americana – Região Centro-Oeste 2. Leishmaniose tegumentar americana – Goiás 3. Leishmaniose – Epidemiologia – Goiás I. Título.

CDU: 616.993.161/.162(817.3)

**Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-
Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Rosana Pereira Morais Balian

Orientador (a): Miriam Leandro Dorta

Co-orientador (a):

Membros:

1. Miriam Leandro Dorta

2. Sandra do Lago Moraes

3. Patrícia Resende Alo Nagib Loyola

Data: 30/04/2014.

Dedico este trabalho ao meu pai João Bosco, exemplo de amor infinito, dedicação, força e perseverança. Aos meus irmãos Rafaela e João Vicente e avós, exemplo de carinho e apoio incondicional. Ao meu esposo Marcelo, companheiro fiel, por tudo que ainda temos por viver. E em especial à minha mãe Maria Edina, a minha grande mestra inspiradora.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me permitido estar na hora certa, com pessoas certas e poder aproveitar a oportunidade para crescer pessoal e profissionalmente.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Miriam Leandro Dorta pela competência, dedicação, ensinamentos e paciência desde o início do trabalho.

À minha querida sócia e mãe, que se sobrecarregou durante o meu mestrado para que eu me dedicasse à pesquisa.

Aos meus amigos e familiares. Obrigada pela paciência e preocupação comigo durante todo esse período.

Aos colegas do laboratório José Vítor, Natália, Grazielle e João Pedro pela colaboração prestada em diferentes e importantes momentos.

Aos professores Milton A. P. de Oliveira, Patrícia Alo Nagib Resende Loyola e Maria Cláudia P. Dantas por todas as correções sugeridas na minha banca de qualificação

Aos professores do IPTSP, pelos ensinamentos transmitidos.

Às agências de fomento: FAPEG e CNPq pelo financiamento do projeto e bolsa de mestrado.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para esta pesquisa.

SUMÁRIO

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	viii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	1
1.2. Epidemiologia da LTA.....	4
1.3. A resposta imune na LTA:.....	7
1.4. Diagnóstico:	8
1.5. Tratamento.....	12
2 JUSTIFICATIVA	13
3 OBJETIVOS	14
3.1. Objetivos gerais:	14
3.2. Objetivos específicos:.....	14
4 MÉTODOS	15
4.1. Local de estudo:	15
4.2. Amostragem:	15
4.3. Preparação do extrato antigênico de <i>L. (V.) braziliensis</i> para execução dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA):	16
4.4. Avaliação do reconhecimento do extrato total de <i>L. (V.) braziliensis</i> por anticorpos de pacientes com LTA: Pesquisa de IgG total por ELISA. 16	
4.5. Identificação do parasito através da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	17
4.5.1. Extração de DNA	17
4.5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP)	17
4.5.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida	18
4.6. Análise estatística.....	19
5 RESULTADOS	20
5.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana da Região Centro-Oeste.....	20
5.2. Dados laboratoriais dos pacientes com LTA.	26
5.3. Avaliação do reconhecimento de extrato total de <i>L. (V.) braziliensis</i> por anticorpos de pacientes com LTA: Pesquisa de IgG total por ELISA. 28	
5.4. Avaliação do reconhecimento de extrato total de <i>L. (V.) braziliensis</i> por anticorpos de pacientes com LTA: Pesquisa de IgG total por ELISA após o início do tratamento.	32
5.5. Identificação das espécies de leishmânias por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	34
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÕES	42
8 REFERÊNCIAS	44
ANEXO 1	54
ANEXO 2	58
ANEXO 3.....	59

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Tabela	Título	Página
Tabela 1	Principais espécies causadoras de LTA no Brasil	3
Tabela 2	Ciclo térmico da PCR	18
Tabela 3	Distribuição segundo o sexo e a faixa etária dos pacientes com LTA atendidos no ambulatório de endemias do Hospital Anuar Auad (HDT/GO), Goiânia, GO	20
Tabela 4	Número de casos conforme a manifestação clínica e os estados da Região Centro-Oeste onde ocorreram as infecções dos pacientes com LTA.	21
Tabela 5	Número de casos e municípios onde ocorreram as infecções dos pacientes com leishmaniose cutânea atendidos no HDT/GO de 2000 a 2006.	23
Tabela 6	Número de casos e municípios onde provavelmente ocorreram as infecções dos pacientes com leishmaniose mucosa atendidos no HDT/GO de 2000 a 2006.	24
Tabela 7	Distribuição segundo o tempo de evolução da lesão entre os pacientes com leishmaniose cutânea atendidos no HDT/GO.	25
Tabela 8	Distribuição segundo o tempo de evolução da lesão e se apresentavam cicatriz sugestiva de LTA entre os pacientes com leishmaniose mucosa.	25
Tabela 9	Distribuição da atividade que os pacientes com LTA exerciam no momento da infecção.	26
Tabela 10	Diagnóstico laboratorial de paciente com LTA atendidos no HDT/GO.	27
Tabela 11	Identificação das espécies de leishmânias por	34

	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de paciente com LTA atendidos no HDT/GO.	
--	---	--

Figura	Título	Página
Figura 1	Desenho esquemático do ciclo de desenvolvimento de parasitos do gênero <i>Leishmania</i> .	2
Figura 2	Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea. Fonte: Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases, 2010.	5
Figura 3	Casos de LTA e percentual, segundo região de residência. Brasil, 2000 a 2008	6
Figura 4	Distribuição geográfica de pacientes com LTA da região Centro-Oeste.	22
Figura 5	Distribuição sazonal dos números de casos de LTA dos pacientes atendidos no HDT/GO de 2000 a 2006.	25
Figura 6	Porcentagem de casos de LTA, segundo a faixa etária (anos) e a IRM, em pacientes atendidos no HDT/GO, de 2000 a 2006.	28
Figura 7	Comparação da positividade dos testes utilizados para diagnóstico de LTA.	29
Figura 8	Deteção de anticorpos IgG para antígenos de <i>L. (V.) braziliensis</i> no soro de pacientes positivos e negativos para LTA.	30
Figura 9	Deteção de anticorpos IgG específicos para extrato total de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> no soro de pacientes com LTA coletados antes do tratamento por ELISA.	31
Figura 10	Deteção de anticorpos IgG específicos para extrato total de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> no soro de pacientes com LTA	33

	coletados após o tratamento por ELISA.	
Figura 11	Produtos da PCR, obtidos de raspado da borda das lesões de pacientes com LTA	34

Anexo	Título	Página
Anexo 1	Parecer do Comitê de Ética	54
Anexo 2	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	58
Anexo 3	Fórmulas	59

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AH – Análise histopatológica

CN – Controle negativo

CPLa – Controle positivo de *Leishmania (L.) amazonensis*

CPLb - Controle positivo de *Leishmania (V.) braziliensis*

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

ED – Exame direto

HDT/GO – Hospital de Doenças Tropicais do estado de Goiás

IC95% - Intervalo de confiança 95%

IFI – Imunofluorescência Indireta

INGOH – Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia

IRM – Intradermorreação de Montenegro

IFN- γ – Interferon gama

IL-4 – interleucina 4

IL-5 – interleucina 5

IL-10 – interleucina 10

IL-12 – interleucina 12

IL-13 – interleucina 13

IL-17 – interleucina 17

IR – Índice de reatividade

IRM – Intradermorreação de Montenegro

K-DNA - DNA extra-nuclear presentes no cinetoplasto

LC – Leishmaniose cutânea

LCD – Leishmaniose cutânea disseminada

LD – Leishmaniose difusa

LM – Leishmaniose mucosa

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Salina tamponado com fosfato

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

PM – Peso molecular

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RP – Razão de prevalência

SFB – Soro fetal bovino

SFM – Sistema fagocítico mononuclear

SNR – Soro não reagente

SR – Soro reagente

TBE – Tris/Borato/EDTA

TGF- β - Fator transformador de crescimento beta

TH1 – referente ao Linfócito T auxiliar do tipo 1 (do inglês “T helper 1”)

TH2 – referente ao Linfócito T auxiliar do tipo 2 (do inglês “T helper 2”)

TH17 – referente ao Linfócito T auxiliar do tipo 17 (do inglês “T helper 17”)

TNF α - Fator de Necrose Tumoral

Treg – Linfócitos T regulatórios

VPN – Valor preditivo negativo

VPP - Valor preditivo positivo

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e/ou mucosas. É uma zoonose endêmica, cujos números de casos na região Centro-Oeste são crescentes. No Estado de Goiás, foram notificados 2798 casos de LTA, entre os anos de 2007 e 2013. No presente trabalho a nossa proposta foi Investigar as características epidemiológicas e moleculares da LTA de pacientes atendidos no ambulatório de endemias do hospital Anuar Auad no período de 2000 a 2006 e identificar as espécies de *Leishmania spp.* Participaram do estudo 152 pacientes com LTA, 124 do Estado de Goiás e 28 do Mato Grosso, com faixa etária de 6 a 79 anos. Destes, 113 eram do sexo masculino. Para o diagnóstico foi realizada a avaliação clínico-epidemiológica e laboratorial, tais como exame direto (ED), análise histopatológica (AH), intradermoreação de Montenegro (IRM), imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA utilizando extrato total de *L. (Viannia) braziliensis*. Foi feita a caracterização das espécies de leishmânias por reação em cadeia da polimerase (PCR). A positividade do ED, AH, IRM, IFI e ELISA foi de 70,6%, 80,9%, 68,9%, 44,2% e 73,0%, respectivamente. Foram detectadas IgG específica para *L. (V.) braziliensis* em 84,7% dos pacientes com leishmaniose mucosa (LM), sendo significativamente superiores às encontradas em pacientes com leishmaniose cutânea (LC), que foi de 69,0% ($p < 0,05$). A detecção de IgG antes e após o tratamento foi feita utilizando ELISA e foi observado que apenas nas amostras dos pacientes com LC obtiveram uma diferença estatística significativa após 6 e 18 meses de tratamento. Os dados do acompanhamento sorológico dos pacientes com LTA antes e após o tratamento indicam que os níveis de IgG total tendem a diminuir após 6 meses de tratamento. A PCR foi realizada em 69 amostras obtidas a partir de raspado das bordas das lesões de pacientes com LTA. Destes, 62 (89,8%) foram positivas, sendo 53 de pacientes com LC e nove de pacientes com LM. As amostras foram caracterizadas por PCR

como *Leishmania (V.) braziliensis* (93,5%) e *L. (L.) amazonensis* (6,5%). Verificou-se que 25,8% dos casos de LTA no Estado de Goiás ocorreram em Campestre, Goiânia, Aparecida de Goiânia e Niquelândia. Ao analisar a frequência de casos de LTA ao longo dos meses durante os anos analisados, observou-se que houve uma distribuição de LTA em todas as estações do ano, com um maior número de casos no inverno. A PCR representa uma importante e poderosa ferramenta no diagnóstico e na identificação das espécies de LTA em áreas endêmicas. O controle da LTA em áreas endêmicas é difícil e requer uma ideia exata de sua epidemiologia.

ABSTRACT

Protozoa of the genus *Leishmania*, which affects the skin and/or mucous membranes, cause American Cutaneous Leishmaniasis (ACL). It is an endemic zoonosis whose numbers of cases in the Brazil Midwest region are growing. In the Goiás state, 2798 ACL cases were been reported between 2007 and 2013. In the present study, our proposal was to investigate the epidemiological and molecular characteristics of ACL patients attended at the ambulatory of the Hospital Anuar Auad in the period 2000 at 2006 and identify the species of *Leishmania sp.* The study included 152 patients with ACL, 124 were from of the state of Goiás and 28 at Mato Grosso, aged between 6-79 years, and center and thirteen these individuals were male. For diagnosis, clinical, epidemiological and laboratory data were collected, such as direct examination (ED), histopathology (AH), Montenegro skin test (MST), indirect immunofluorescence (IIF). ELISA using crude extract of *L. (Viannia) braziliensis* was performing. Characterization of *Leishmania* species was carried out by polymerase chain reaction (PCR). The positivity of ED, AH, MST, IIF and ELISA was 70.6%, 80.9%, 68.9%, 44.2% and 73.0%, respectively. Specific IgG to *L. (V.) braziliensis* were detecting in 84.7% of patients with mucosal leishmaniasis (ML), significantly higher than those found in patients with cutaneous leishmaniasis (CL), which was 69.0% ($p < 0.05$). Detection of IgG before and after treatment was performed using ELISA and was observed a statistically significant difference only in samples obtained from patients with CL after 6 and 18 months of treatment. The data serological monitoring of patients with ACL before and after treatment indicates that the total IgG levels tend to decrease after 6 months of treatment. PCR was performed on 69 samples obtained from scraping the edge of lesions of patients with ATL, these, 62 (89.8%) were positive, 53 patients with LC and 9 patients with ML. The samples were characterized by PCR as *L. (V.) braziliensis* (93.5%) and *L. (L.) amazonensis* (6.5%). It was found that 25.8% of cases of leishmaniasis in the state of Goiás occurred in

Campestre, Goiânia, Aparecida de Goiânia and Niquelândia. By analyzing the frequency of cases of ATL over the months during the years analyzed, it was observed that there was a distribution of ACL in all seasons from 2000 to 2006, with a larger number of cases in winter. PCR represents important and powerful tool in the diagnosis and species identification in ACL in endemic areas. ACL controlling in endemic areas is difficult and requires an accurate idea of its epidemiology.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças que apresentam características clínicas, histopatológicas e imunológicas distintas, causada por um protozoário intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), principalmente macrófagos. Este é taxonomicamente classificado na ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), dividido nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Apresenta duas formas durante seu ciclo vital: amastigota (esférica, sem flagelo visível e é uma forma intracelular de células de hospedeiros vertebrados) e promastigota (longa, flagelada e que se desenvolve no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados, os flebotomíneos, bem como em meio de cultura) (REY, 2001; NEVES, 2011).

A leishmaniose é uma zoonose primariamente de animais silvestres, sobretudo roedores, transmitida por flebotomíneos de florestas tropicais, do gênero *Lutzomya* (Díptera, *Psychodidae*, *Phlebotominae*) (ARAGÃO, 1922) (Cerqueira, 1920). Seres humanos têm uma suscetibilidade variada à doença, embora não façam parte da cadeia de transmissão habitual (LIEW & O'DONNELL, 1993; HERWALDT, 1999). Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo infectado, introduz a forma promastigota metacíclica no hospedeiro vertebrado, e esta é fagocitada por células do sistema fagocítico monocitário, principalmente macrófagos, transformando-se em formas amastigotas, que se multiplicam por divisão binária. Posteriormente, se um flebotomíneo não infectado alimentar-se do sangue ou linfa intersticial de um hospedeiro infectado, ele ingere formas amastigotas que irão se transformar em formas promastigotas no intestino do flebotomíneo, que posteriormente irão migrar para a probóscide após se diferenciar em formas promastigotas metacíclicas, que serão inoculadas no hospedeiro vertebrado em um próximo

repasto sanguíneo, completando o ciclo heteroxênico (REY, 2001; NEVES, 2011) (Figura 1).

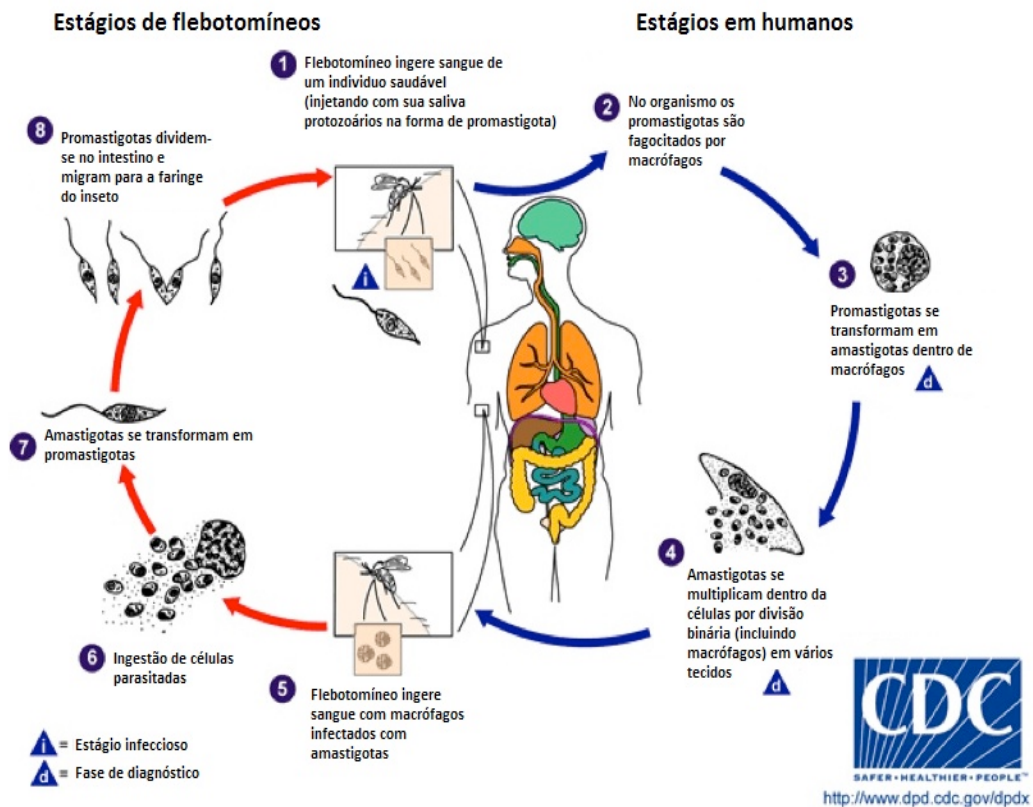


Figura 1. Desenho esquemático do ciclo de desenvolvimento de parasitos do gênero *Leishmania*. Fonte: www.dpd.cdc.gov/dpdx

No Brasil são reconhecidas pelo menos seis espécies de *Leishmania* causadoras da LTA no homem, principalmente a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* e, mais raramente, a *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* (GRIMALDI & TESH, 1993; PASSOS et al., 1999). Estas espécies são morfologicamente similares, apresentando particularidades relativas às manifestações clínicas (Tabela 1), vetores, reservatórios, distribuição geográfica e até mesmo à resposta terapêutica (GRIMALDI & TESH, 1993).

Tabela 1. Principais espécies causadoras de LTA no Brasil.

Subgênero	Espécie	Manifestação Clínica
Viannia (LAINSON & SHAW, 1972)	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> (Vianna, 1911)	Lesões cutâneas e mucosas
	<i>L. (V.) guyanensis</i> (FLOCH, 1954)	Predominantemente lesões cutâneas
	<i>L. (V.) lainsoni</i> (SILVEIRA et al., 1987)	Rara ocorrência, provocando lesões cutâneas
	<i>L. (V.) naiffi</i> (LAINSON; SHAW, 1989)	Rara ocorrência, provocando lesões cutâneas
	<i>L. (V.) shawi</i> (SHAW et al., 1991)	Rara ocorrência, provocando lesões cutâneas
Leishmania (LAINSON & SHAW, 1987)	<i>L. (L.) amazonensis</i> (SHAW & LAINSON, 1972)	Lesões cutâneas e, eventualmente, cutâneo-difusas

A LTA pode apresentar várias formas clínicas (WHO, 2013), de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida, é classificada em (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; SILVEIRA et al., 2009; GOTO & LINDOSO, 2010):

- leishmaniose cutânea localizada (LC), é a forma mais comum, apresenta ulcerações na pele que são localizadas e geralmente únicas, e podem evoluir para cura espontânea, deixando cicatrizes atróficas com superfície lisa. A úlcera típica apresenta formato ovalado ou arredondado, com base eritematosa, infiltrada e de consistência firme e bordas elevadas, medindo de alguns milímetros a alguns centímetros.
- leishmaniose cutânea disseminada (LCD), é caracterizada por inúmeras lesões papulares e de aparência acneiformes distribuídas por várias regiões do corpo, que posteriormente podem ulcerar.
- leishmaniose difusa (LD), é uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular à antígenos de *Leishmania*. É caracterizada por proliferação exacerbada do parasito, com lesões múltiplas, difusas por toda a pele, que se apresentam em forma de nódulos.

- leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose mucosa (LM) têm como principal agente etiológico a *L. (V.) braziliensis* (AMATO et al., 2009). Na maioria das vezes elas são secundárias às lesões cutâneas. São caracterizadas por destruição do tecido, envolvendo mucosas e cartilagens. Estas lesões surgem lentamente (LESSA et al., 2007). Na LMC também aparecem lesões na pele.

Estas variações nas manifestações clínicas são consequências também de uma complexa resposta imunológica do hospedeiro e de suas características genéticas. Assim, a doença passa a ter um amplo espectro de variação clínica, com prognóstico variável, indo desde formas que evoluem para cura espontânea, a formas resistentes à terapêutica convencional (SILVEIRA et al., 2009; BENICIO et al., 2011). Cerca de 90% dos casos de LTA (cutânea e mucocutânea) no Brasil são causadas por *L. (V.) braziliensis* e esta é a espécie que desenvolve as lesões mais graves e está frequentemente associada à invasão de mucosas (AMATO et al., 2009).

1.2. Epidemiologia da LTA

A LTA é uma doença endêmica em 88 países, principalmente na América Latina, África, Ásia Sul e Central, Oriente Médio e Mediterrâneo. De 70 a 75% da incidência global dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Argélia, Etiópia, Sudão, Colômbia, Costa Rica, Brasil e Peru (Figura 2) (WHO, 2013).

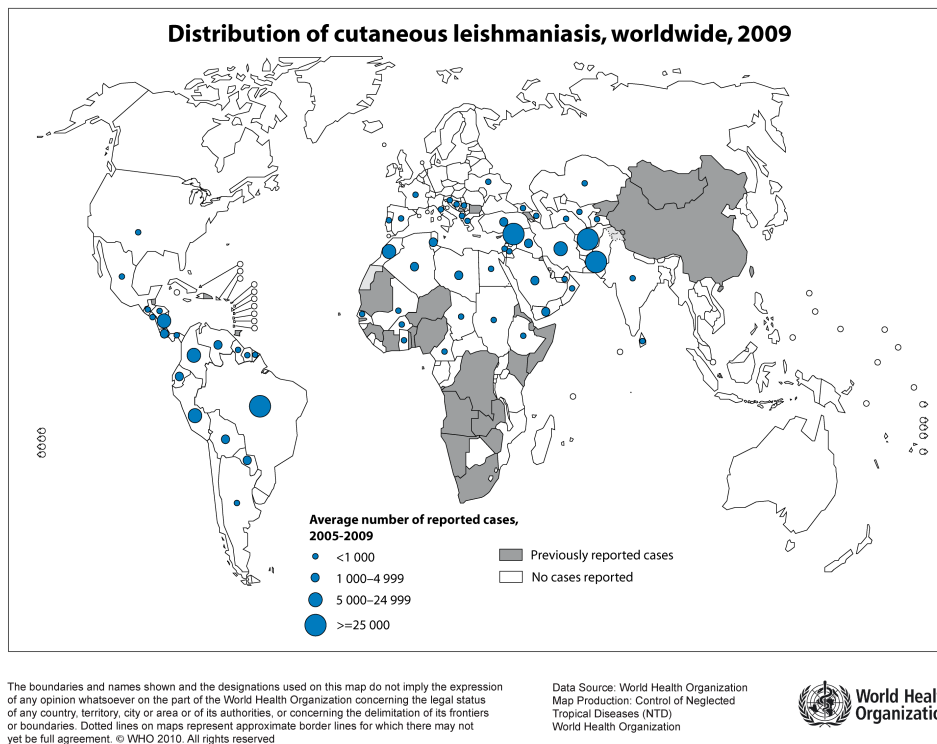


Figura 2 – Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea. Fonte: Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases, 2010. Disponível em: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_leishmaniasis_cutaneous_2009.png. Acessado em 12 de dezembro de 2013.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a prevalência mundial da doença seja de 12 milhões de casos, com uma mortalidade anual de 60.000 casos. Por muitos anos, o impacto da leishmaniose na saúde pública tem sido subestimado, pois se acredita que anualmente surgem 0,7 a 1.2 milhão de casos, sendo que apenas 600.000 são notificados (WHO, 2013).

No Brasil de 2005 a 2012 foram registrados 180.270 casos de LTA com média anual de 22.534 novos casos (WHO, 2013). Os maiores percentuais de casos no país ocorrem nas regiões Norte e Nordeste, seguidos das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (Figura 3) (SINAN/SVS/MS, 2010).

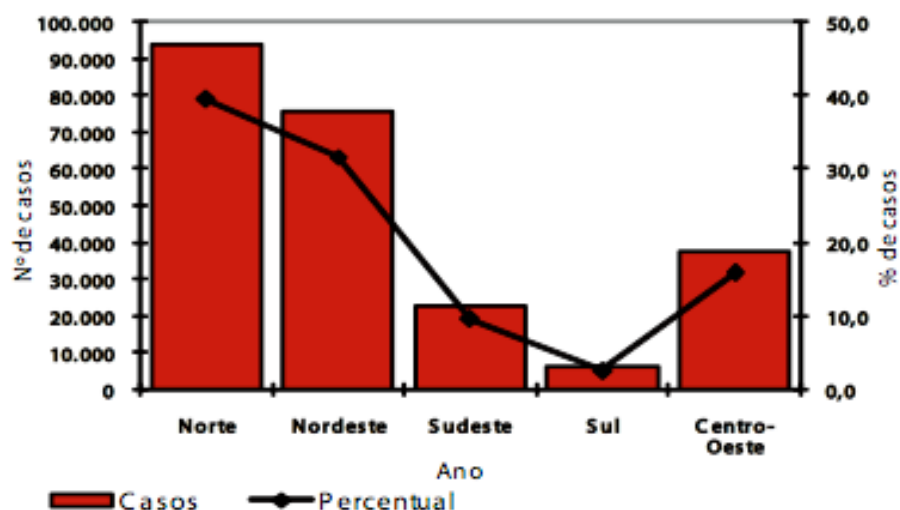


Figura 3. Casos de LTA e percentual, segundo região de residência. Brasil, 2000 a 2008. Fonte: Sinam/SVS/MS

O estado de Mato Grosso, em 2009, registrou o maior número de casos de LTA do Brasil, com 3900 casos confirmados distribuídos em 95% dos municípios. O sexo masculino representou 82,6% dos casos e 94,8% ocorreram em maiores de 10 anos (SVS/MS/MT, 2011).

O estado de Mato Grosso do Sul, em 2009, notificou 105 casos de LTA, 37,2% dos casos ocorreram nos municípios de Campo Grande, Naviraí, Pedro Gomes e Sonora. O sexo masculino representou 81,9% dos casos e 91,4% ocorreram em maiores de 10 anos (SVS/MS/MS, 2011).

No estado de Goiás, o número de casos de LTA confirmados notificados em 2007 foram 377, em 2008 foram 408, em 2009 foram 519, em 2010 foram 631, em 2011 foram 344, em 2012 foram 368 e em 2013 foram 151 (SINAN/SVS/MS, 2014) Os municípios com maiores números de casos foram: Niquelândia, Minaçu, Goiânia, Mineiros, Baliza, Doverlândia, São Miguel do Araguaia, Rio Verde, São Domingos, Caiapônia, Uruaçu, Aparecida de Goiânia, Jataí e Porangatu. O sexo masculino representou 70,9% dos casos e 95,7% ocorreram em maiores de 10 anos (SVS/MS/GO, 2011).

1.3. A resposta imune na LTA:

Para um melhor entendimento de infecções humanas e mecanismos imunológicos de resistência aos parasitos intracelulares como *Leishmania*, têm sido utilizados modelos de infecções experimentais com diferentes linhagens de camundongos. Em experimentos com camundongos isogênicos das linhagens BALB/c e C57BL/6 com *Leishmania major* verifica-se uma diferença na evolução clínica da doença. Camundongos C57BL/6 apresentam resistência à infecção, sendo capazes de controlá-la. Enquanto que camundongos BALB/c são susceptíveis à infecção, apresentando a doença de forma progressiva (SCOTT, 1989; SCOTT & SCHARTON, 1994). A resistência à infecção por leishmânia está associada ao desenvolvimento de uma resposta do tipo linfócito T auxiliar 1 (TH1), com a produção de interferon gama (IFN- γ) induzida por interleucina 12 (IL-12), enquanto que a susceptibilidade é decorrente de uma resposta do tipo linfócito T auxiliar 2 (TH2), com elevada produção de Interleucina 4, 10 (IL-4, IL-10) (HEINZEL et al., 1989; SCOTT, 1989; SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002) e interleucina 13 (IL-13) (MATTHEWS et al., 2000).

Em humanos, sabe-se que para o controle da infecção é necessário uma alta produção de IFN- γ para ativar macrófagos, para que ocorra a morte do parasito intracelular devido à liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), diminuindo assim a carga parasitária (GREEN et al., 1990; LIEW et al., 1990). Recentemente, foi evidenciado que as primeiras células fagocíticas a chegarem no local da infecção são os neutrófilos, que atuam como “Cavalo de Tróia”, ou seja, os neutrófilos infectados são fagocitados por macrófagos (LASKAY et al. 2008; PETERS et al., 2008). Quando a lesão está ativa, ocorre uma exacerbação da resposta imune com a produção simultânea de IFN- γ e fator de necrose tumoral (TNF- α) (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998), podendo levar à lesão tecidual. Neste momento, os linfócitos T regulatórios (Treg) modulam esta resposta imune através da produção de IL-10 e fator transformador de crescimento beta (TGF- β) (BELKAID, 2003). A ativação de linfócitos TH2 leva ao agravamento da lesão devido à produção de IL-4, IL-5 e IL-10, sendo associado à replicação exacerbada do parasito (PIRMEZ et al., 1993). Assim, apesar da imunopatogênese da LM e LMC ser complexa e parcialmente desconhecida, observa-se uma diminuição dos níveis de IL-10 e

TGF- β , e uma exacerbação de produção de IFN- γ e TNF- α , sugerindo uma discreta presença de Treg, ocorrendo destruição tecidual, envolvendo mucosas e cartilagens (BACELLAR et al., 2002; SILVEIRA et al., 2009; DUTRA et al., 2011).

A infecção por *Leishmania* em humanos é caracterizada pelo aparecimento de anticorpos anti-*Leishmania* no soro. Estes não são importantes no controle do parasito, mas há evidências de que podem ser utilizados como biomarcadores da doença, auxiliando nos critérios de cura e acompanhamento da infecção no paciente (SHARMA & SINGH, 2009; FAGUNDES-SILVA et al., 2012). Na detecção de subclasses de IgG anti-*Leishmania*, a IgG1 foi capaz de diferenciar indivíduos saudáveis de áreas endêmicas de indivíduos com lesão ativa ou passada de LTA. Enquanto que a IgG3 foi útil para discriminar pacientes de lesão ativa de pacientes sem história prévia de LTA ou com lesão curada (CASTELLANO et al., 2009; FAGUNDES-SILVA et al., 2012).

1.4. Diagnóstico:

O diagnóstico da LTA abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais e frequentemente a associação de alguns desses elementos é necessária para se chegar a uma conclusão final.

O diagnóstico clínico da LTA pode ser realizado com base nas características da lesão associadas à anamnese do paciente. Entretanto, como esta doença produz um amplo espectro de lesões, o diagnóstico clínico nem sempre é simples e imediato (SARAVIA et al., 1989; GONTIJO & DE CARVALHO, 2003).

No diagnóstico epidemiológico, investiga-se a procedência de áreas endêmicas, atividade ocupacional e lazer em áreas de vegetação primária, margens de rios ou desmatamento e a ocupação de áreas de matas secundárias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Nas lesões mucosas, devem ser também considerados a ocorrência de tratamento anterior para LTA, preexistência de lesões cutâneas ou cicatrizes compatíveis (MARZOCHI, 1992).

No diagnóstico laboratorial pode se utilizar métodos parasitológicos e

imunológicos. Nos métodos parasitológicos ocorre a demonstração do parasito, que pode ser conseguida através de pesquisa direta e indireta. O exame direto é a pesquisa de formas amastigotas em material obtido da borda da lesão por escarificação, aspiração ou biópsia, corado por *Giemsa* ou *Leishman*, utilizando o microscópio. É o método de primeira escolha por ser mais rápido, de menor custo e de fácil execução (FURTADO, 1980; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). A probabilidade de encontro do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após um ano (MARZOCHI, 1992). Nos casos de infecção por *L. (V.) braziliensis* a probabilidade está em torno de 100% nos dois primeiros meses de evolução, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses (GONTIJO & DE CARVALHO, 2003). O exame indireto consiste no isolamento do parasito por meio do cultivo *in vitro* entre 24°C e 26°C (WALTON et al., 1977; SHAW & LAINSON, 1981) ou inoculação em animais de laboratório do material coletado da lesão, preferencialmente nas patas posteriores, focinho e peritônio de camundongos (OLIVEIRA et al., 2010). Os métodos parasitológicos permitem a identificação do parasito, entretanto podem apresentar problemas, como a demora em se obter os resultados, a possibilidade de contaminação da cultura e dificuldades no crescimento do parasito (WEIGLE et al., 1987; GONTIJO & DE CARVALHO, 2003; SINGH, 2006; OLIVEIRA et al., 2010).

O exame histopatológico geralmente é utilizado no diagnóstico diferencial de processos ulcerativos indefinidos, já que o diagnóstico de certeza só é dado com a identificação do parasito nos tecidos. Através de alterações dérmicas ou de córion de mucosa, foi possível identificar cinco padrões histopatológicos: reação exsudativa celular, reação exsudativa celular e necrótica, reação exsudativa e necrótica-granulomatosa, reação exsudativa e granulomatosa e reação exsudativa e tuberculóide (DE MAGALHÃES et al., 1986; GONTIJO & DE CARVALHO, 2003). A avaliação por imunohistoquímica é importante para confirmar o diagnóstico quando o exame histopatológico apresenta inflamação crônica inespecífica e/ou reação granulomatosa com poucos parasitos, já que esta técnica apresenta uma melhor visualização das formas amastigotas através da reação antígeno-anticorpo (AMATO et al., 1998; SHIRIAN et al., 2014).

Os exames imunológicos são indicadores indiretos da infecção por *Leishmania*. Dentre estes testes, a intradermorreação de Montenegro (IRM) e os testes sorológicos são os mais utilizados (VIDIGAL et al., 2008). A IRM fundamenta-se na visualização da resposta de hipersensibilidade celular tardia. A técnica consiste na inoculação do antígeno na face flexora do antebraço. A leitura é realizada de 48 ou 72 horas após a inoculação. A reação é considerada positiva quando detecta-se endurecimento igual ou superior a 5 mm (MONTENEGRO, 1926). Geralmente o indivíduo se torna reator em torno de 4 meses após o início da lesão cutânea e persiste positiva após o tratamento, ou cicatrização da lesão cutânea tratada ou curada espontaneamente (GONTIJO & DE CARVALHO, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Os testes sorológicos, ensaio imunoenzimático (ELISA) e Imunofluorescência indireta (IFI), têm sido empregados, com considerável importância, no diagnóstico e em inquéritos epidemiológicos. A análise de anticorpos anti-*Leishmania* permite avaliar a evolução da doença, bem como fornecer dados sobre as características de sua resposta imune. Variados perfis e níveis de imunoglobulinas específicas à *Leishmania* têm sido detectados em paciente com LTA, refletindo não só a carga parasitária, mas também o tempo de infecção e fatores intrínsecos do próprio hospedeiro (GUTIERREZ et al., 1991).

Dentre os métodos sorológicos, a reação de Imunofluorescência Indireta (IFI), que detecta anticorpos específicos circulantes, é a mais utilizada, sendo recomendada pelo Ministério da Saúde, desde que associada à IRM e/ou testes parasitológicos, já que ocorre reação cruzada com outras doenças como doença de Chagas e Leishmaniose Visceral (LV) (BRITO et al., 2000). Além disso, a IFI apresenta resultados variáveis na LTA, não tendo correlação entre os níveis de anticorpos circulantes e o estágio da doença (REIS et al., 2008). Sua sensibilidade é em torno de 50% a 70% (MENDONÇA et al., 1988; BRITO et al., 2000). A IFI tem baixa sensibilidade comparada ao ensaio imunoenzimático (ELISA) e é difícil de realização em grande escala, já que é uma técnica manual, que depende de profissionais treinados para sua realização (EDRISSIAN & DARABIAN, 1979; MANCIANTI et al., 1995). A técnica de ELISA ainda não está

disponível comercialmente, e o seu uso é restrito à pesquisa, podendo ser usada em grande escala, já que é uma técnica com possibilidade de automação (FERREIRA et al., 2006; VIDIGAL et al., 2008). A citometria de fluxo vem sendo utilizada como um método para detectar anticorpos anti-*L. (V.) braziliensis* vivas (ROCHA et al., 2006) e anticorpos anti-*L. (V.) braziliensis* fixadas (PISSINATE et al., 2008) com alta sensibilidade e especificidade. Apresentou um diagnóstico diferencial entre LTA e outras doenças dermatológicas, como lepra e esporotricose (PISSINATE et al., 2008; PEREIRA et al., 2012), e em cães foi utilizada para distinguir o perfil sorológico de cães infectados por *L. chagasi* de cães vacinados com a vacina Leishmune® através da detecção de classes e subclasses de IgG (DE ANDRADE et al., 2007).

Nos últimos anos, técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para a detecção e identificação de *Leishmania* (MARQUES et al., 2001; DISCH et al., 2005) e se tornaram importantes ferramentas no diagnóstico da leishmaniose, já que apresentam uma alta sensibilidade, como por exemplo, a amplificação de sequências específicas de DNA extra-nuclear presentes no cinetoplasto (k-DNA) do parasito (VOLPINI et al., 2004; GOMES et al., 2008; MARCUSSI et al., 2008). Outra vantagem das técnicas de diagnóstico molecular é a possibilidade de aplicação mesmo quando dispomos de pequenas amostras de material ou amostras estocadas. A PCR se dá em três fases: desnaturação, anelamento ou hibridização e extensão ou polimerização. Na desnaturação, ocorre a separação da fita dupla do DNA em duas fitas únicas, promovida por elevação da temperatura em graus variáveis, entre 90 e 95 graus. Na segunda fase, anelamento, ocorre a demarcação das extremidades do DNA de interesse, nas duas fitas resultantes da fase anterior, utilizando um pequeno fragmento de DNA chamado iniciador, que é sintetizado *in vitro* a partir de uma sequência de oligonucleotídeos previamente conhecida. Na polimerização, a *Taq* DNA polimerase liga os nucleotídeos entre si, completando a fita simples, e transformando-a em dupla, promovendo sua extensão. A partir daí ocorre uma reação em cadeia, sendo que os fragmentos de DNA recém-formados fornecem mais moldes para a montagem de novas fitas nos ciclos subsequentes (BLACKWELL, 1992). Atualmente este procedimento é totalmente automatizado. Utiliza-se o termociclador, programado para ajustar tempo, temperatura e o

número de ciclos específicos para o objetivo que se pretende alcançar. O produto amplificado obtido pela reação pode ser analisado por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. Porém, resultados falso-negativos podem ocorrer na presença de substâncias inibidoras de amplificação na amostra e dificuldades na extração. E o que limita o seu uso na rotina são as exigências técnicas e o custo (GONTIJO & DE CARVALHO, 2003; REIS et al., 2008).

1.5. Tratamento

Os antimoniais pentavalentes (antimoniato de N-metil glucamina e o stibogluconato de sódio) são indicados para o tratamento de todos os tipos de manifestações clínicas de leishmaniose, embora as formas LMC e LM exijam maior cuidado, por apresentarem resposta mais lenta e maior possibilidade de recidivas. A Organização Mundial da Saúde recomenda que a dose desse antimonial seja calculada em mg/Kg/dia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Podem ocorrer um ou mais efeitos colaterais, tais como artralgias, mialgia, inapetência, náuseas e outros. Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelos antimoniais pentavalentes, já que recentemente têm-se reportado resistência à droga de 1ª escolha, recorre-se às drogas de segunda escolha, como a Anfotericina B e o Isotionato de Pentamidina, que são mais tóxicas (TUON et al., 2008; ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010). As drogas utilizadas apresentam um custo elevado, requerem um regime de tratamento longo e estão se tornando menos efetivas. Considerando a LTA um problema de saúde pública, novas estratégias de controle e/ou combate da doença devem e estão sendo investigadas (AMEEN, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

A LTA é uma zoonose de crescente distribuição no Brasil, com características epidemiológicas complexas, considerando não apenas as formas clínicas, diagnóstico e tratamento, mas também o controle, sendo uma doença endêmica no país, com número de casos crescentes na região Centro-Oeste e de grande importância para a saúde pública. Sem o estabelecimento de parâmetros epidemiológicos e caracterização de espécies a doença continuará negligenciada, permanecendo sem intervenção e deixando mais vulneráveis à emergência contínua de surtos na região e estados vizinhos. A caracterização do perfil epidemiológico da doença e das espécies de parasitos envolvidas são essenciais para que possam ser propostas novas estratégias de controle.

A caracterização das espécies em pacientes com LTA é primordial no estabelecimento do conhecimento sobre o complexo ciclo de transmissão da região, bem como para a elaboração de prognósticos precisos e terapia adequada, evitando o aparecimento de novas lesões e a progressão da doença, já que espécies diferentes de *Leishmania* apresentam resposta imune e manifestações clínicas variáveis (GOTO & LINDOSO, 2010; BACHA et al., 2011). Assim, se justifica um estudo que tem como principal objetivo determinar o perfil epidemiológico atual da LTA na região Centro-Oeste, e especificamente no estado de Goiás, os fatores de risco, a prevalência e a distribuição geográfica das espécies. Este estudo pretende contribuir com informações que poderão auxiliar em um melhor entendimento da imunopatogenia e da imunopatologia da LTA e contribuir para o conhecimento e caracterização da doença no país a fim de direcionar as intervenções que possam ser feitas.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais:

Investigar as características clínicas, epidemiológicas, laboratoriais e moleculares da LTA de pacientes atendidos no ambulatório de endemias do Hospital Anuar Auad, no período de 2000 a 2006.

3.2. Objetivos específicos:

- Avaliar os aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes com LTA;
- Analisar os pacientes de acordo com o sexo, a idade, manifestação clínica, local de infecção, tempo de doença e resposta clínica antes e após o tratamento;
- Detectar o reconhecimento do extrato total de *L. (V.) braziliensis* por anticorpos de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA utilizando ELISA;
- Associar os dados clínicos com os resultados laboratoriais;
- Comparar a sensibilidade dos testes laboratoriais utilizados para o diagnóstico da LTA;
- Caracterizar as espécies de *Leishmania* em amostras biológicas dos pacientes atendidos no ambulatório de endemias do HDT no período de 2000 a 2006.

4 MÉTODOS

4.1. Local de estudo:

Este estudo foi realizado no laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP – UFG).

4.2. Amostragem:

Os dados utilizados para este estudo descritivo foram restritos a amostras de pacientes atendidos no ambulatório de Endemias do HDT/Hospital Anuar Auad, Centro de referência de leishmanioses no Estado de Goiás, no período de 2000 a 2006, sob a coordenação da infectologista Dra. Ledice I A Pereira. As amostras dos controles sadios foram obtidas do Banco de Sangue do Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH). O presente projeto é associado ao “Banco imunobiológico de leishmanioses da região Centro-Oeste (*Leishbank*) e projetos associados”, cujos protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas (HC – UFG), Proc. Nº 125/2004 (ANEXO 1). Os pacientes leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes de doarem o sangue (ANEXO 2). Foram incluídos pacientes diagnosticados com LTA, após a realização de exame clínico e epidemiológico, exames laboratoriais tais como intradermoreação de Montenegro (IRM), reação de imunofluorescência indireta (IFI), histopatológico com detecção de amastigotas confirmadas por imunohistoquímica e considerando LTA nos pacientes que apresentavam pelo menos dois destes exames positivos.

Foram utilizadas 152 amostras de pacientes com LTA, estocadas na soroteca do *Leishbank*. Em 87 destes foi realizada a pesquisa de anticorpos antes e após o tratamento. Assim, foram utilizados no presente estudo um total

de 239 amostras.

4.3. Preparação do extrato antigênico de *L. (V.) braziliensis* para execução dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA):

Os parasitos utilizados nos experimentos, *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), foram cultivados *in vitro* em meio Grace completo (Grace's Insect Medium, Sigma Chemical Co., St Louis, MD, EUA), pH 5,8, suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cripion, Andradina, SP, Brasil) inativado, 2 mM de L- glutamina (Sigma), 100 U/mL de penicilina (Sigma) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma). As culturas foram mantidas em estufa apropriada à 26°C e o repique dos parasitos foi feito periodicamente. Na fase exponencial, foram lavados três vezes e ressuspensos em 1 mL de PBS (salina tamponada com fosfato). Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer, ajustados para uma concentração de 5×10^8 parasitos/mL e armazenados a -80°C (nitrogênio líquido). Para a sensibilização das placas de ELISA ("high binding surface" – "flat bottom", Costar) os parasitos eram então descongelados e submetidos a cinco séries consecutivas de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho Maria a 37°C para romper os parasitos e liberar as proteínas antigênicas. Para evitar degradações proteolíticas durante a preparação e a utilização do antígeno, foi utilizado um coquetel de inibidores de proteases na quantidade de 10 µL/mL (SIGMA).

4.4. Avaliação do reconhecimento do extrato total de *L. (V.) braziliensis* por anticorpos de pacientes com LTA: Pesquisa de IgG total por ELISA.

Para a detecção dos níveis séricos de imunoglobulinas G específicas para extrato total de *L. (V.) braziliensis*, placas de ELISA ("high binding surface" – "flat bottom", Costar) foram sensibilizadas com 50 µL da solução de extrato total de *L. (V.) braziliensis* (5×10^6 parasitos/poço) em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,06 M. Após incubação de 16 horas a 4°C, as placas foram bloqueadas com PBS e soro fetal bovino (SFB) a 2,5% (PBS/SFB); em seguida foram adicionados os soros dos pacientes com diferentes formas clínicas de LTA (N= 239) diluídos a 1/50 em PBS-SFB 1%. Após incubação de 1 hora a 37°C, as

placas foram lavadas com PBS-T20 0,05%. Em seguida foi adicionado conjugado anti-IgG total humana marcado com peroxidase (Bio-Rad) diluído em PBS-SFB 1% (1/2000) e após incubação de 1 h a 37°C as placas foram lavadas com PBS-T20. A reação foi revelada com solução cromogênica (OPD e H₂O₂) e interrompida com H₂SO₄ 2 N. A leitura foi realizada em leitora de ELISA, a 492 nm (SALAY et al., 2007).

4.5. Identificação do parasito através da reação em cadeia da polimerase (PCR)

4.5.1. Extração de DNA

Para a extração do DNA das amostras das lâminas obtidas de raspado das bordas das lesões de pacientes com LTA atendidos no HDT/GO, inicialmente foi adicionado 50 µL de água milliQ autoclavada sobre a lâmina com a amostra do paciente e em seguida o material foi aspirado e colocado em tubo de 2 mL e foi utilizado o *Purelink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)* para extração do DNA, de acordo com as orientações do fabricante.

4.5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP)

Para a amplificar o DNA extraído, utilizou-se dois oligonucleotídeos, complementares, usados como iniciadores, para a detecção do parasito. A reação foi realizada utilizando 2 µL de cada iniciador 150 (10 mM): 5` GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA 3` e 152 (10 mM): 5` (C/G)(C/G)(C/G)-(A/T)CTAT(A/T) TTACACCAACCCC 3` (PASSOS et al., 1999), juntamente com 0,4 µL de dUTP (200 mM), 1,2 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 50 mM, 2 µL de tampão da PCR e 0,16 µL Taq DNA polimerase (*Invitrogen Recombinant Brazilian®*) (VOLPINI et al., 2004) e 2 µL de DNA da amostra.

Em cada reação da PCR, além das amostras era amplificado também um controle negativo, que continha a mesma mistura da reação, menos o DNA e

dois controles positivos no qual, DNA de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) amazonensis*.

A reação foi realizada em termociclador automático (*Eppendorf – Mastercycler personal*) com os seguintes ciclos térmicos:

Tabela 2. Ciclo térmico da PCR

TEMPERATURA	TEMPO	Nº CICLOS
94°C	5 minutos (desnaturação inicial)	1
94°C	45 segundos (desnaturação intermediária)	35
59°C	45 segundos (anelamento)	35
72°C	30 segundos (extensão intermediária)	35
72°C	7 minutos (extensão final)	1
4°C	Fim da reação	

4.5.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos amplificados da PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, com voltagem de 50 V por 20 minutos e 100 V por 70 minutos.

O gel foi preparado com 6 mL de sopa primitiva a 8% (ANEXO 3), 62,5 µL de persulfato de amônio a 10% e 6,25 µL de TEMED. O tampão de corrida utilizado foi o TBE 1X (Tris/Borato/EDTA) (ANEXO 3). Em cada poço do gel, adicionou-se 5 µL de cada produto da PCR.

Para a visualização da corrida, fez a impregnação do gel de poliacrilamida pelo nitrato de prata. Para isto, foi necessário deixar o gel por 10 minutos, sob agitação constante, em uma cuba com solução fixadora (15 mL de etanol P.A., 750 µL de ácido acético P.A. e água milliQ quantidade suficiente para 150 mL). Posteriormente, colocá-lo por 10 minutos, sob agitação constante, em solução de nitrato de prata 0,2%. E após retirar o excesso com água, acrescentou-se a solução reveladora (45 mL de solução de hidróxido de sódio e 450 µL de formaldeído), deixando em agitação constante até o aparecimento de bandas nítidas.

4.6. Análise estatística

Os dados do ELISA estão expressos em Índice de Reatividade (IR), que foi calculado pela fórmula $IR = \text{média dos valores da densidade óptica de cada soro (em duplicata)} / \text{cut off}$, onde o *cut off* da placa foi estabelecido pela média da densidade óptica de 6 amostras negativas (em duplicata) mais dois desvios padrões. Amostras iguais ou acima de 1,0 foram consideradas positivas. Os resultados foram avaliados pelo teste pareado *t de Student* e teste não pareado *Mann Whitney*, com a utilização do programa Graph Pad Prism 5.0 Software. Os dados foram compilados em planilhas no Microsoft® Office Excel® 2007, para as análises de distribuição de frequências foi utilizado o Epi Info™ versão 7.1.3. E a associação entre variáveis foi verificada por meio do teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado. Entre os métodos de diagnóstico verificou-se o grau de linearidade pela Correlação de Pearson. Foi considerado para todos os testes um nível de significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana da Região Centro-Oeste.

O estudo foi realizado com 152 amostras de pacientes com LTA atendidos no ambulatório de endemias do Hospital Anuar Auad (HDT/GO) na cidade de Goiânia, estado de Goiás entre 2000 e 2006. Destes, 113 (74,3%) eram do gênero masculino e 39 (25,7%) feminino. A doença acometeu as faixas etárias de 6 a 79 anos, com uma média de 38,7 anos, uma mediana de 39 anos, prevalecendo a faixa etária entre 30 e 59 anos (54,6% dos casos) (IC95%= 46,3-62,7). Não foi observada uma associação entre a faixa etária e o sexo ($p=0,570$) (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição segundo o sexo e a faixa etária dos pacientes com LTA atendidos no ambulatório de endemias do Hospital Anuar Auad (HDT/GO), Goiânia, GO

Faixa etária (anos)	Sexo		Total (%)	IC95%
	Masculino (%)	Feminino (%)		
6-14	3 (2,7)	2 (5,1)	5 (3,3)	1,1-7,5
15-29	21 (18,6)	5 (12,8)	26 (17,1)	11,5-24,0
30-59	63 (55,7)	20 (51,3)	83 (54,6)	46,3-62,7
60-79	5 (4,4)	4 (10,3)	9 (5,9)	2,7-10,9
ND	21 (18,6)	8 (20,5)	29 (19,1)	13,2-26,2
Total	113 (74,3)	39 (25,7)	152 (100)	

ND= não determinado. $\chi^2=2,93$ ($p=0,570$)

De acordo com o relato dos pacientes, 124 (81,6%) adquiriram a infecção no estado de Goiás e 28 (18,4%) no Mato Grosso (Tabela 4), destacando a região centro, sul e noroeste goiano e nordeste mato-grossense, em que ocorreram um maior número de casos de acordo com a Figura 4. Dos pacientes com LTA

analisados, 74,3% apresentavam leishmaniose cutânea (LC) e 25,7% leishmaniose mucosa (LM), prevalecendo a LC (IC95%= 66,6-81,1). Os estados de Goiás e Mato Grosso não apresentaram diferença estatística significativa em relação às manifestações clínicas ($p=0,429$) (Tabela 4). Os municípios onde provavelmente ocorreram as infecções dos pacientes com LC e LM estão descritos na Tabela 5 e 6, respectivamente. Verificou-se que 25,8% dos casos de LTA no estado de Goiás ocorreram em Campestre, entorno de Goiânia, Aparecida de Goiânia e Niquelândia (Tabela 5 e 6). Ao analisar a frequência dos casos de LTA ao longo dos meses durante os anos analisados, observou-se que houve uma distribuição de LTA em todas as estações do ano de 2000 a 2006, com um maior número de casos no inverno (Figura 5).

Tabela 4. Número de casos conforme a manifestação clínica e os estados da região Centro-Oeste onde ocorreram as infecções dos pacientes com LTA.

	Região Centro-Oeste		Total (%)	IC95%
	Goiás (%)	Mato Grosso (%)		
LC	91 (73,4)	22 (78,5)	113 (74,3)	66,6-81,1
LM	33 (26,6)	6 (21,5)	39 (25,7)	18,9-33,4
Total	124 (81,6)	28 (18,4)	152 (100)	

LC: leishmaniose cutânea; LM: leishmaniose mucosa
 Teste Exato de Fisher ($p=0,429$)

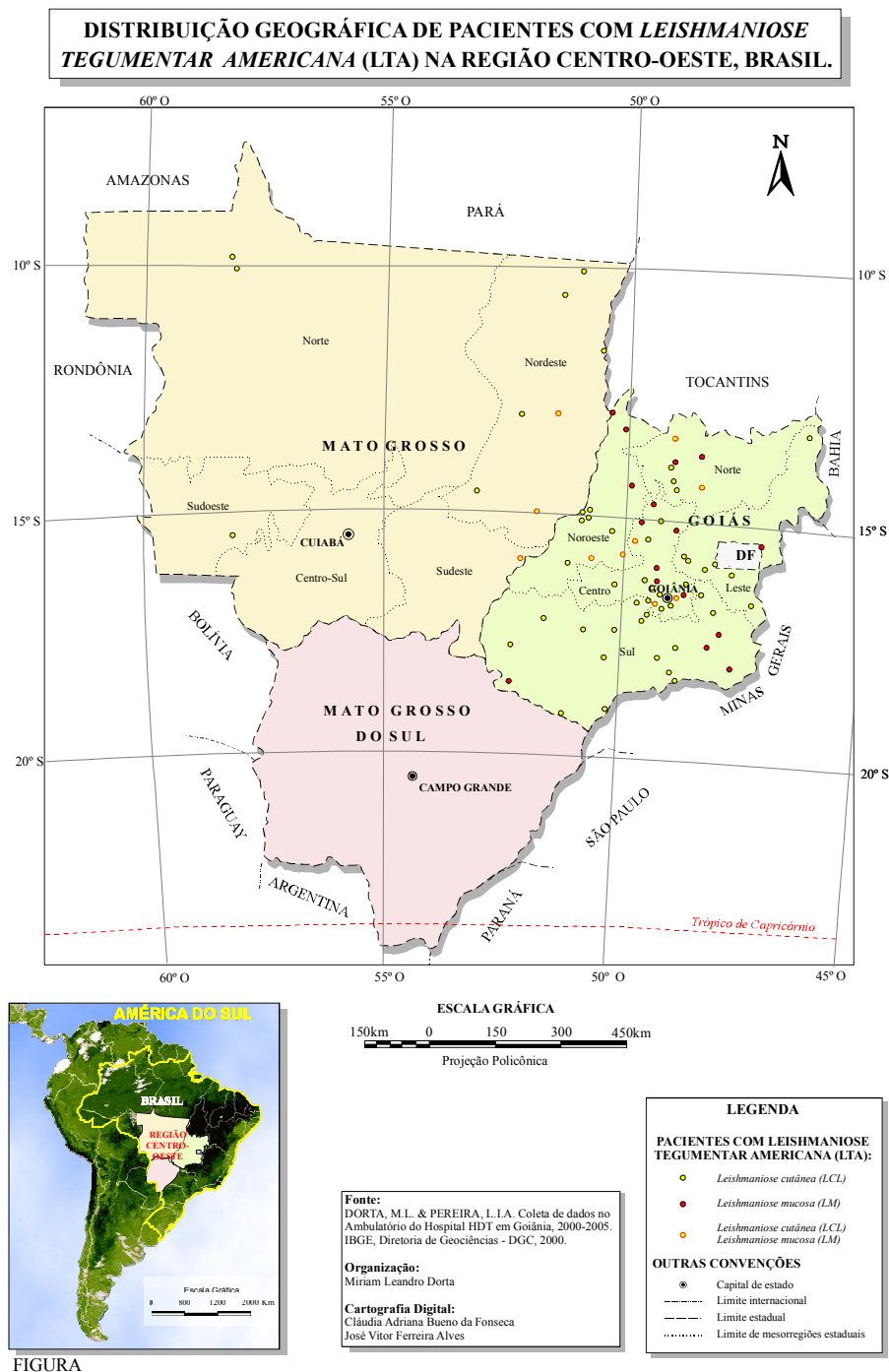


Figura 4. Distribuição geográfica de pacientes com LTA da região Centro-Oeste. ----- Limite de mesorregiões estaduais: ● Município com casos de Leishmaniose cutânea (LC); ● Município com casos de Leishmaniose mucosa (LM); ● Município com casos de Leishmaniose cutânea (LC) e Leishmaniose mucosa (LM).

Tabela 5. Número de casos e municípios onde ocorreram as infecções dos pacientes com leishmaniose cutânea atendidos no HDT/GO de 2000 a 2006.

Goiás	N	Goiás	N
Acreúna	1	Orizona	1
Alexânia	1	Palmeiras	2
Anápolis	1	Porangatu	1
Anicuns	1	Posselândia	1
Aparecida de Goiânia	4	Santa Bárbara	1
Aragoiânia	1	Santa Helena	1
Araguapaz	2	Santo Antônio do Descoberto	1
Aruanã	1	São Domingos	1
Caiapônia	2	São Luís Montes Belos	1
Campestre	15	São Simão	1
Campinorte	1	Senador Canedo	1
Cidade de Goiás	2	Silvânia	4
Corumbá	1	Trindade	1
Cristalina	1	Uruaçu	1
Faina	2	Uruana	1
Goiânia	7	Não determinado	2
Guapó	2	Total	91
Itajá	1		
Itapuranga	1	Mato Grosso	N
Itumbiara	1	Barra do Garças	1
Jandaia	1	Campinápolis	1
Joviânia	1	Canabrava do Norte	1
Jussara	1	Cascalheira	2
Luziânia	1	Cotriguaçu	1
Mara Rosa	1	Jauru	1
Matrincha	1	Juruena	1
Mineiros	1	Querência	1
Montes Claros	1	São Félix do Araguaia	1
Montividiu	1	Vila Rica	5
Morrinhos	1	Nova Xavantina	1
Mozarlândia	2	Não determinado	6
Niquelândia	2	Total	22
Nova Glória	1		

Tabela 6. Número de casos e municípios onde provavelmente ocorreram as infecções dos pacientes com leishmaniose mucosa atendidos no HDT/GO de 2000 a 2006.

Goiás	N	Mato Grosso	N
Caldas Novas	1	Barra do Garças	1
Campinaçu	1	Cascalheira	1
Catalão	1	Nova Xavantina	1
Chapadão do Sul	1	Não determinado	3
Cidade de Goiás	1		
Estrela do Norte	1		
Formosa	1		
Goianésia	1		
Goiânia	1		
Guapó	1		
Inhumas	1		
Itapuranga	1		
Jussara	2		
Luiz Alves	1		
Niquelândia	3		
Pilar de Goiás	1		
Pires do Rio	1		
Pilar de Goiás	1		
Rubiataba	2		
São Miguel do Araguaia	4		
Senador Canedo	1		
Santa Rosa	1		
Terezinha	1		
Terezópolis	1		
Total	33	Total	6

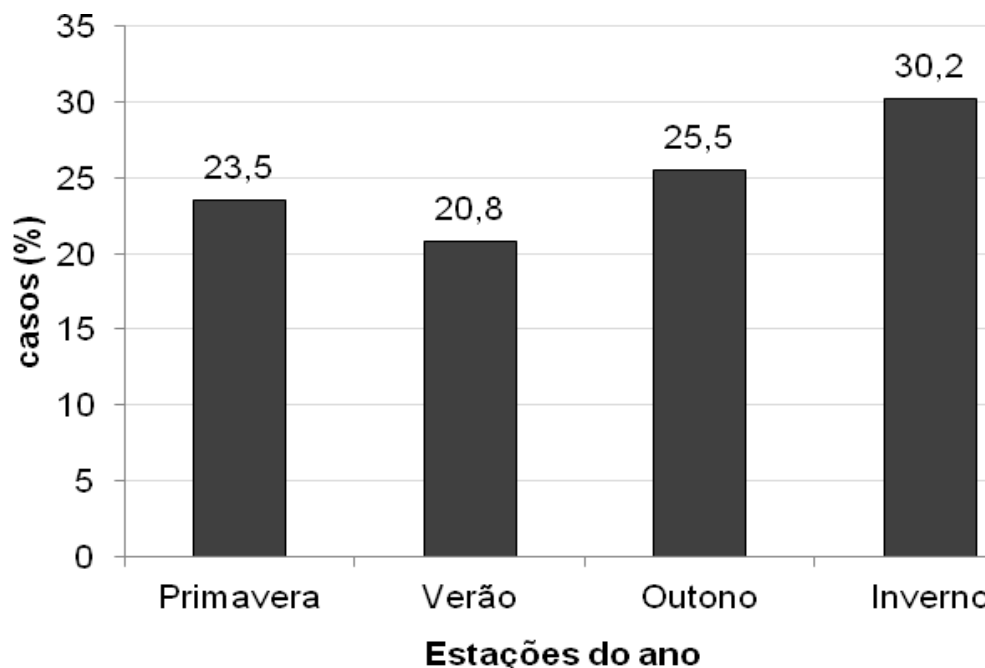


Figura 5. Distribuição sazonal dos números de casos de LTA dos pacientes atendidos no HDT/GO de 2000 a 2006.

O tempo de evolução das lesões dos pacientes com LC variou de 15 dias a 24 meses de lesão, a mediana foi de três meses, conforme é mostrado na Tabela 7. Observa-se que 84,3% dos pacientes apresentavam a lesão até no máximo seis meses após a infecção. Nos pacientes com LM o tempo de evolução das lesões variou de 2 meses a 20 anos, sendo a mediana de 3 anos. De 30 pacientes com LM, dezoito (60%) apresentavam cicatrizes sugestivas de LTA (Tabela 8).

Tabela 7. Distribuição segundo o tempo de evolução da lesão entre os pacientes com leishmaniose cutânea atendidos no HDT/GO.

Tempo de evolução lesão*	N (%)	IC95%
< 3 meses	35 (39,3)	29,1-50,3
3 a 6 meses	40 (45,0)	34,4-55,9
> 6 meses	14 (15,7)	8,9-25,0
Total	89 (100)	

*Excluídos os pacientes com informação não determinada.

Tabela 8. Distribuição segundo o tempo de evolução da lesão e se apresentavam cicatriz sugestiva de LTA entre os pacientes com leishmaniose mucosa.

Tempo de evolução lesão*	N (%)	IC95%	Cicatriz LTA	IC95%
< 2 anos	12 (40)	22,7-59,4	9 (50,0)	26,0-74,0
2 a 5 anos	9 (30)	14,7-49,4	4 (22,2)	6,4-47,6
> 5 anos	9 (30)	14,7-49,4	5 (27,8)	9,7-53,5
Total	30 (100)		18 (60,0)	

*Excluídos os pacientes com informação não determinada.

A Tabela 9 apresenta a atividade que os pacientes com LTA exerciam no momento da infecção. Segundo relato dos 152 pacientes, 12 (10,6%) infectaram-se em atividades de lazer como pesca, caça ou acampamento, 80 (70,8%) durante o trabalho e 21 (18,6%) no domicílio ou peridomicílio. Dos 80 pacientes que adquiriram a infecção durante o trabalho, 55 (48,7%) tinham profissão relacionada à área rural (lavrador, pecuarista, Movimento Sem Terra) e 25 (22,1%) à área urbana (motorista e operador de máquinas). Observou-se uma diferença estatística significativa ao relacionar as manifestações clínicas com a atividade exercida no momento da infecção ($p=0,007$) (Tabela 9).

Tabela 9. Distribuição da atividade que os pacientes com LTA exerciam no momento da infecção.

Atividade*	LC (%)	LM (%)	Total (%)	RP (IC95%)
Lazer**	7 (58,3)	5 (41,7)	12 (10,6)	1
Trabalho				
Área rural***	38 (69,1)	17 (30,9)	55 (48,7)	1,18 (0,71-1,97)
Área urbana****	24 (96,0)	1 (4,0)	25 (22,1)	1,65 (1,02-2,67)
Domiciliar/peridomiciliar	13 (61,9)	8 (38,1)	21 (18,6)	1,06 (0,59-1,90)
Total	82 (72,6)	31 (27,4)	113 (100)	

*Atividade que os pacientes com LTA exerciam no momento da infecção, conforme relato do paciente. **Lazer: pesca, caça ou acampamento. *** Paciente do Movimento Sem Terra, lavrador ou pecuarista. **** Profissão: motorista ou operador de máquinas. RP: Razão de prevalência. $\chi^2=12,152$ ($p=0,007$)

5.2. Dados laboratoriais dos pacientes com LTA.

Foram utilizados para diagnóstico de LTA dos pacientes atendidos no ambulatório de endemias do HDT os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Os testes laboratoriais realizados foram exame direto (ED), análise histopatológica (AH), Intradermorreação de Montenegro (IRM) e/ou

Imunofluorescência indireta (IFI) (Tabela 10). A IRM foi considerada reator com endureção acima de 5 mm e a IFI foi considerada positiva quando teve título acima de 1/40. Utilizando o grau de linearidade pela Correlação de Pearson para correlação entre os métodos de diagnóstico, verificou-se que apesar de ter dado uma diferença estatística significativa entre IRM e AH ($p=0,025$), a probabilidade desta correlação foi fraca, em torno de 5%. Entre os outros métodos não houve correlação ($p>0,005$).

Tabela 10. Diagnóstico laboratorial de paciente com LTA atendidos no HDT/GO.

Resultado	Positivo/Reator	Negativo/Não reator	Total
Exame Direto	53 (70,7)	22 (29,3)	75
Análise Histopatológica	89 (80,9)	21 (19,1)	110
Intradermorreação de Montenegro	91 (68,9)	41 (31,1)	132
Imunofluorescência Direta	61 (44,2)	77 (55,8)	138

A positividade dos testes de diagnóstico de pacientes com LTA foi de 70,6% para ED, 80,9% para AH, 68,9% para IRM, e 44,2% para IFI (Figura 7).

A Figura 6 demonstra que dos cinco pacientes de 6 a 14 anos, 60% foram reatores para a IRM; dentre os 26 entre 15 e 29 anos, 57,7% foram reatores; dentre os 83 entre 30 e 59 anos, 60,3% foram reatores e dentre os nove entre 60 e 79 anos, 66,6% foram reatores.

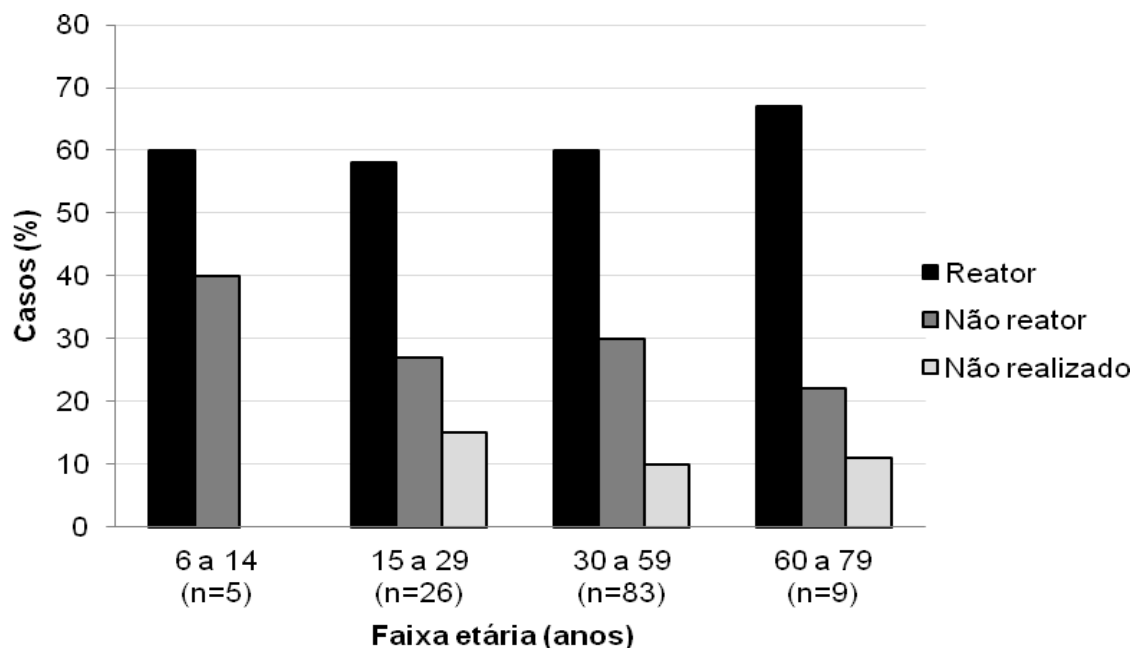


Figura 6. Porcentagem de casos de LTA, segundo a faixa etária (anos) e a IRM, em pacientes atendidos no HDT/GO, de 2000 a 2006. IRM: Intradermorreação de Montenegro.

5.3. Avaliação do reconhecimento de extrato total de *L. (V.) braziliensis* por anticorpos de pacientes com LTA: Pesquisa de IgG total por ELISA.

Neste estudo foi avaliada a técnica de ELISA para detecção de anticorpos específicos para a leishmânia utilizando o extrato total de *L. (V.) braziliensis*. Das 152 amostras de pacientes com LTA analisadas, 111 foram reagentes. Este teste apresentou uma positividade de 73,0% (Figura 7). Foram avaliadas 40 amostras de indivíduos saudáveis, destes, 2 pacientes tiveram anticorpos IgG que reconheceram o extrato total de *L. (V.) braziliensis* (Figura 8). A especificidade apresentada pelo ELISA foi de 95%. O valor preditivo positivo (VPP), ou seja, a probabilidade de existir a doença uma vez que o teste seja positivo, foi de 98,2% e a probabilidade de não existir a doença uma vez que o teste foi negativo, ou seja, o valor preditivo negativo (VPN) foi de 48,1%.

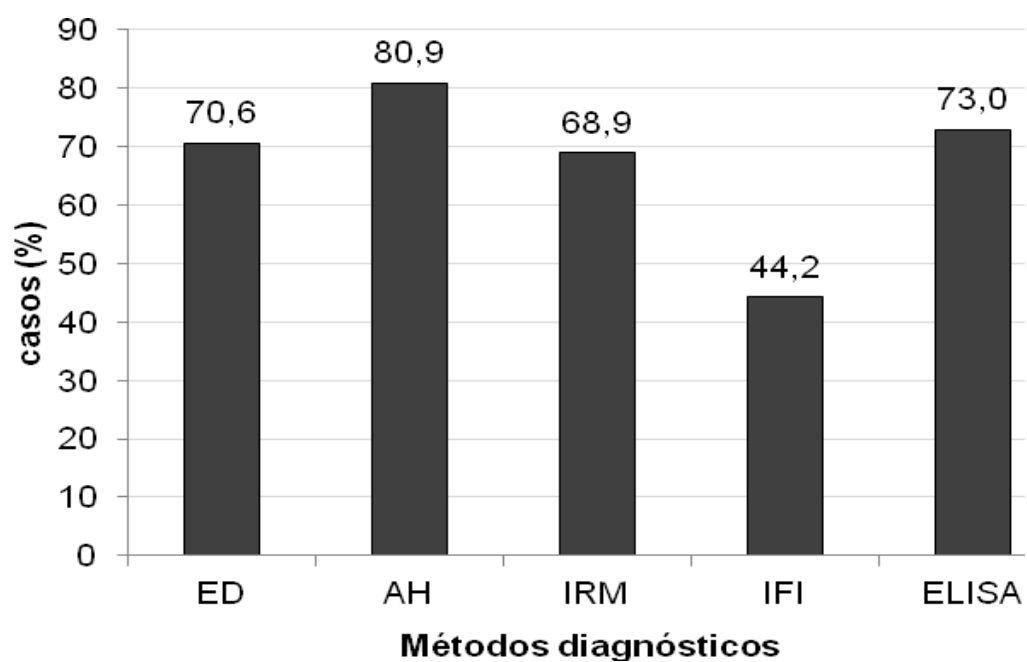


Figura 7. Comparação da positividade dos testes utilizados para diagnóstico de LTA. ED: exame direto; AH: análise histopatológica; IRM: intradermorreação de Montenegro; IFI: Imunofluorescência direta; ELISA: ensaio imunoenzimático.

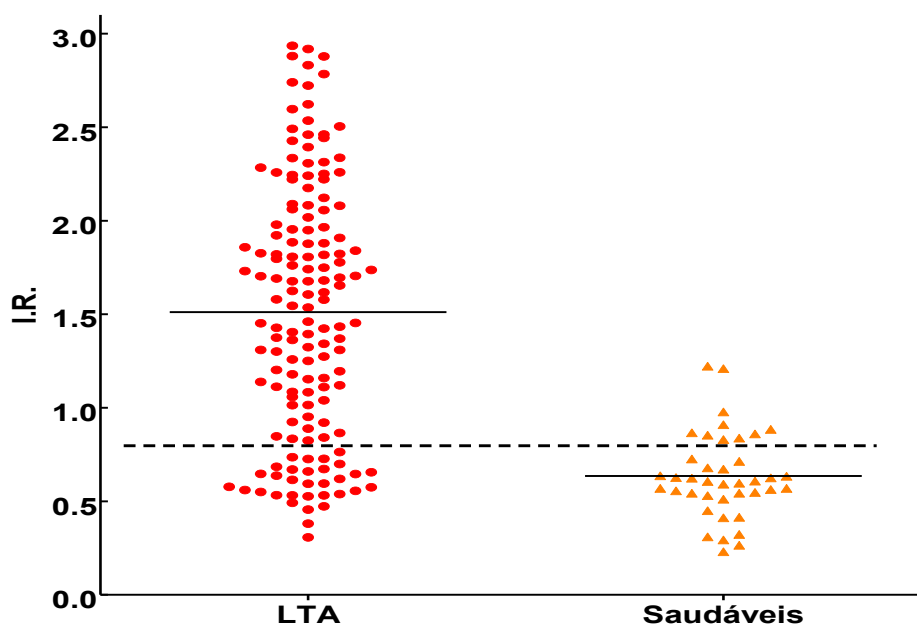
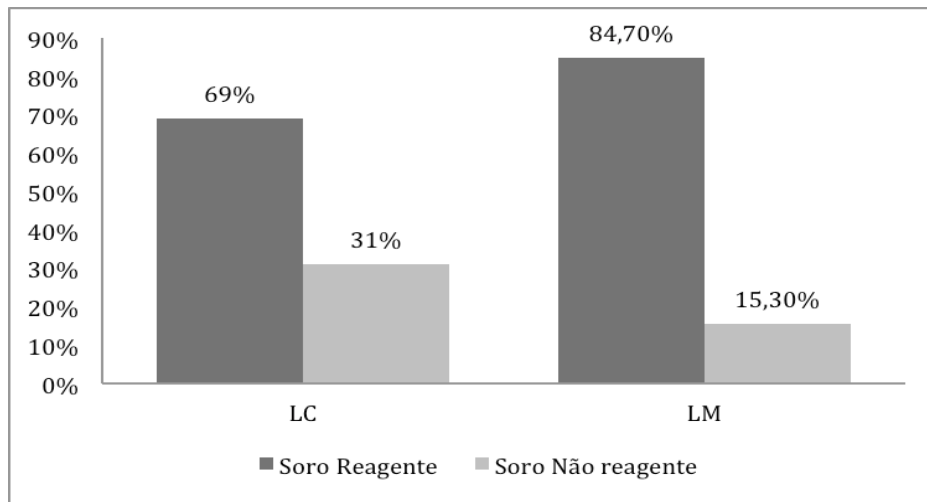


Figura 8. Detecção de anticorpos IgG para antígenos de *L. (V.) braziliensis* no soro de pacientes positivos e negativos para LTA.—Amostras positivas para LTA (n=152) e negativas para LTA (n=40). Os anticorpos foram detectados por ELISA. Cada ponto indica o índice de reatividade (IR) de cada amostra. $IR \geq 1$: soro reagente (SR), $IR < 1$: soro não reagente (SNR). (—) Mediana (---) IR.

Na estratificação das amostras dos pacientes de acordo com as manifestações clínicas, os anticorpos IgG específicos para *L. (V.) braziliensis* foram detectados por ELISA nos soros de 78 pacientes com LC (69,0%) e 33 pacientes com LM (84,7%) (Figura 9A), houve uma diferença estatística significativa entre os dois grupos ($p < 0,05$) (Figura 9B).

A.



B.

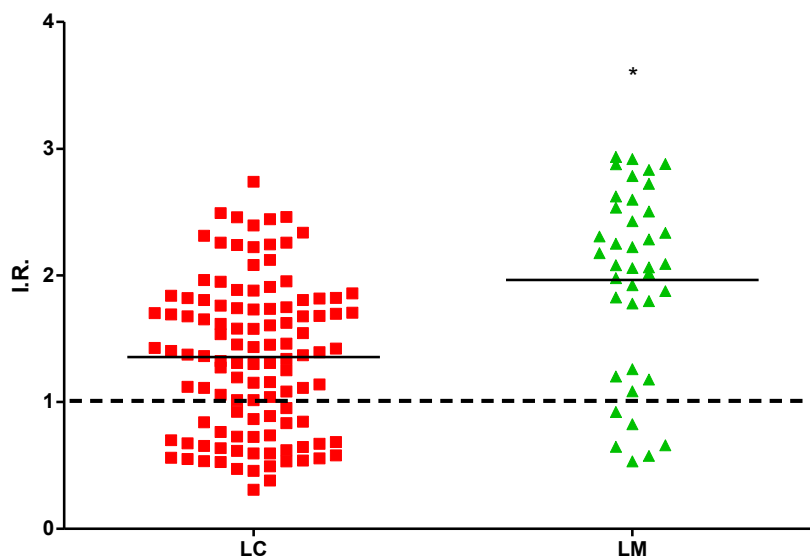


Figura 9. Detecção de anticorpos IgG específicos para extrato total de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* no soro de pacientes com LTA coletados antes do tratamento por ELISA. (A) Porcentagem de pacientes reagentes e não reagentes para LC (leishmaniose cutânea, n= 113) e LM (leishmaniose mucosa, n= 39). (B) Cada ponto indica o índice de reatividade (IR) de cada amostra. IR $\geq$ 1: soro reagente (SR), IR < 1: soro não reagente (SNR). (—) Mediana (----) IR.* valor significativo pelo teste t Mann Whitney (p<0,05).

5.4. Avaliação do reconhecimento de extrato total de *L. (V.) braziliensis* por anticorpos de pacientes com LTA: Pesquisa de IgG total por ELISA após o início do tratamento.

Após 3 meses do início do tratamento, 12 pacientes retornaram para avaliação clínica e laboratorial. Destes pacientes, 8 apresentavam LC e 4 LM. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre aos níveis de IgG específicas para extrato total de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* no soro de pacientes após 3 meses do início do tratamento, tanto na LC (Figura 10A) quanto na LM (Figura 10B).

Após 6 meses do início do tratamento, 49 pacientes retornaram para avaliação clínica e laboratorial. Destes pacientes, 35 apresentavam LC e 14 LM. Nos pacientes com LC, os níveis de IgG diminuíram após 6 meses do início do tratamento, foi observada uma diferença estatisticamente significativa na detecção de IgG específicos para *L. (V.) braziliensis* no soro destes pacientes ($p < 0,05$, Figura 10C). Nos pacientes com LM, os níveis de IgG não sofreram alterações significantes 6 meses após a primeira avaliação (Figura 10D).

Após 12 meses do início do tratamento, 10 pacientes retornaram para avaliação clínica e laboratorial. Destes pacientes, 7 apresentavam LC e 3 LM. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre aos níveis de IgG específicas para *L. (V.) braziliensis* no soro de pacientes após 12 meses do início do tratamento, tanto na LC (Figura 10E) quanto na LM (Figura 10F).

Após 18 meses do início do tratamento, 8 pacientes retornaram para avaliação clínica e laboratorial. Destes pacientes, 5 apresentavam LC e 3 LM. Nos pacientes com LC, os níveis de IgG diminuíram após 18 meses do início do tratamento, foi observada uma diferença estatisticamente significativa na detecção de IgG específicos para *L. (V.) braziliensis* ($p < 0,05$, Figura 10G). Nos pacientes com LM, os níveis de IgG não sofreram alterações significantes 18 meses após a primeira avaliação (Figura 10H).

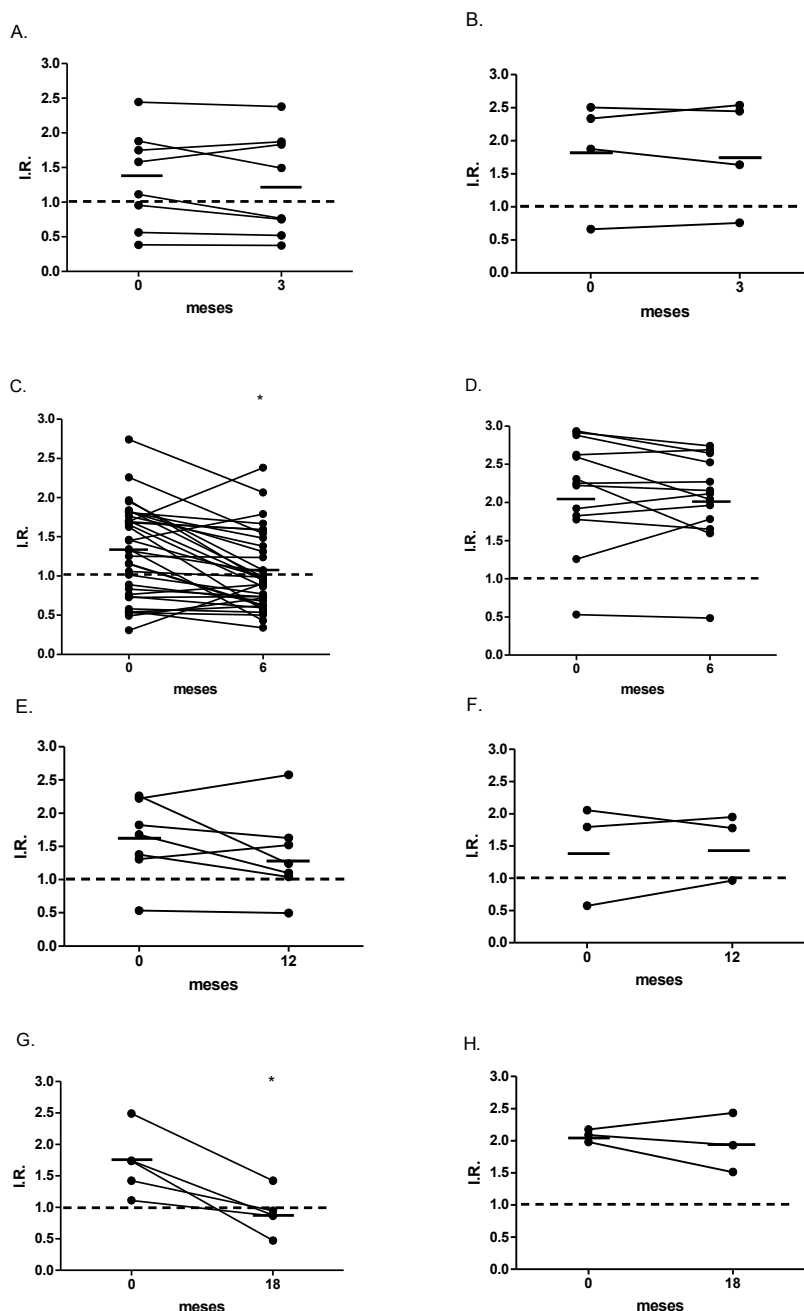


Figura 10. Detecção de anticorpos IgG específicos para extrato total de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* no soro de pacientes com LTA coletados após o tratamento por ELISA. (A) Pacientes com LC antes e após 3 meses de tratamento, (B) Pacientes com LM antes e após 3 meses de tratamento, (C) Pacientes com LC antes e após 6 meses de tratamento, (D) Pacientes com LM antes e após 6 meses de tratamento, (E) Pacientes com LC antes e após 12 meses de tratamento, (F) Pacientes com LM antes e após 12 meses de tratamento, (G) Pacientes com LC antes e após 18 meses de tratamento, (H) Pacientes com LM antes e após 18 meses de tratamento. Cada ponto indica o índice de reatividade (IR) de cada amostra. $IR \geq 1$: soro reagente (SR), $IR < 1$: soro não reagente (SNR), * valor significativo pelo teste *t de student* ($p < 0,05$), (—) Mediana (-----) IR.

5.5. Identificação das espécies de leishmânias por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A PCR foi realizada em 69 amostras obtidas a partir de raspado da borda de lesões de pacientes com LTA. Destas, 62 (89,8%) foram positivas (Figura 11), sendo 53 de pacientes com LC e nove de pacientes com LM. Das amostras caracterizadas, 58 (93,5%) eram de *L. (V.) braziliensis* e 4 (6,5%) eram de *L. (L.) amazonensis*. Não foi observada uma diferença estatística significativa ao relacionar as manifestações clínicas com as espécies ($p=0,469$) (Tabela 11).

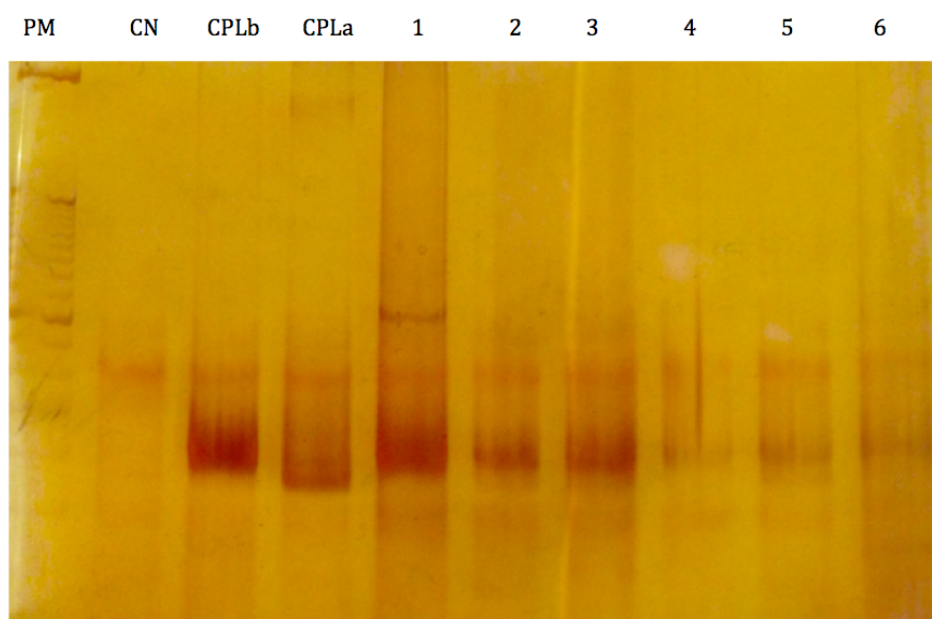


Figura 11. Produtos da PCR, obtidos de raspado da borda das lesões de pacientes com LTA (linhas de 1 a 6). PM (peso molecular); CN (controle negativo); CPLb (controle positivo de *Leishmania (V.) braziliensis*); CPLa (controle positivo de *Leishmania (L.) amazonensis*); gel de poliacrilamida.

Tabela 11. Identificação das espécies de leishmânias por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de paciente com LTA atendidos no HDT/GO.

Espécies	LC (%)	LM (%)	Total (%)	IC95%
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	51(94,4)	8 (88,9)	58 (93,5)	84,5-98,2
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	3 (5,6)	1 (11,1)	4 (6,5)	1,8-15,5
Total	53(85,7)	9 (14,3)	62 (100)	

Teste Exato de Fisher ($p=0,469$)

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho a nossa proposta foi Investigar as características epidemiológicas e moleculares da LTA de pacientes atendidos no ambulatório de endemias do hospital Anuar Auad no período de 2000 a 2006 e identificar as espécies de *Leishmania spp* prevalentes e sua distribuição geográfica na região Centro- Oeste.

Inicialmente, verificamos que 81,6% das amostras analisadas no presente estudo pertenciam a pacientes que adquiriram a infecção no estado de Goiás, principalmente das regiões centro, sul e noroeste goiano e 18,4% no estado do Mato Grosso, destacando a região nordeste. Isto se deve ao fato das amostras serem de pacientes atendidos no ambulatório de endemias de leishmanioses do hospital Anuar Auad (HDT), Goiânia, Goiás, que é um centro de referência de endemias do estado de Goiás e da região Centro-Oeste. A maioria dos casos que ocorreram no Mato Grosso foram próximos à divisa com Goiás. Em 1965 foi comprovada, pela primeira vez, a existência de LTA em Goiás, foram descritos casos autóctones (BARBOSA et al., 1965). Dos casos identificados no estado de Goiás, 25,8% ocorreram em Campestre, Goiânia, Aparecida de Goiânia e Niquelândia. De acordo com o Ministério da Saúde, Niquelândia é o município com o maior número de casos de LTA notificados no estado de Goiás (SINAN/SVS/MS, 2011). O Mato Grosso é o quinto estado do Brasil e o primeiro da região Centro-Oeste com maior incidência de LTA. Entre os anos de 1990 e 2011, o Estado acumulou 74.844 casos. No mesmo período, Goiás teve 13.457 registros, seguido de Mato Grosso do Sul com 4.914 casos (SANOFI AVENTIS, 2013).

Tem-se conhecimento de que a maioria das espécies de flebotomíneos tende a aumentar a densidade nos meses mais quentes e úmidos (GOMES, 1977), apesar da existência de espécies que se mostram mais densas nas épocas secas e frias (GALATI et al., 1996). No presente trabalho, houve uma distribuição de LTA em todas as estações do ano de 2000 a 2006, com um maior número de casos no inverno, período de estiagem. Este fato se deve ao período de incubação da doença e, também pode estar relacionado ao período

de cultivo, em que o manejo do solo ocorre nos períodos de estiagem, e geralmente envolvem desmatamento e queimadas, produzindo alterações no habitat natural do flebótomo (GALATI et al., 1996; MARTINS et al., 2004).

Em estudo realizado no Estado de São Paulo, foi relatado que a LTA acometeu crianças de 6 a 14 anos e adultos (GUIMARÃES et al., 1983). Em Londrina, (PONTELLO; GON; OGAMA, 2013) também verificou-se a ocorrência da doença em crianças e adultos acima de 50 anos. No presente trabalho, ocorreram casos de LTA em pacientes de 6 a 79 anos de idade, , sugerindo a ocorrência de infecção no domicílio e peridomicílio na região, que foi confirmada com o relato destes pacientes (18,6%), reforçando as observações já encontradas na literatura (JIRMANUS et al., 2012). Das amostras avaliadas, 74,3% eram do gênero masculino, e 54,6% apresentavam idade entre 30 e 59 anos, indicando que a região Centro-Oeste apresenta dados similares aos relatados pelo Ministério da Saúde, em que 73,3% dos casos de LTA no Brasil ocorrem entre homens e que a maioria da população afetada é adulta (SINAN/SVS/MS, 2010). Foi observado também que 10,6% dos pacientes adquiriram a infecção em atividades de lazer como caça, pesca ou acampamento e 70,8% adquiriram durante o trabalho. Destes, 48,7% eram trabalhadores rurais, sugerindo que o ciclo da *Leishmania* ainda se mantém nas margens dos rios, córregos e áreas de desmatamento da região como relatado por FILHO (2004); FRANÇA et al. (2009) e NONOSE et al. (2009). Porém, há relatos na literatura de que o número de casos em áreas urbanas está aumentando, tendo os animais domésticos como potenciais reservatórios (FERREIRA et al., 2009). Fato também observado no estado do Paraná, em que apenas 16,8% dos casos de LTA ocorreram em área domiciliar e peridomiciliar (CURTI et al., 2009). Em Pernambuco, a maioria dos casos notificados ocorreram em homens durante o trabalho (DE BRITO et al., 2008). Na cidade de Campinas/SP, 90% dos casos de LTA do 1992 a 1995 ocorreram em área domiciliar situada a menos de 200 metros de uma mata (NASSER et al., 2009). Enquanto que CARVALHO e cols (2010) observaram que em Belo Horizonte/MG houve uma predominância de casos provenientes de áreas urbana. No Acre, ao comparar o percentual de casos de LTA segundo a ocupação no período de 1992 a 1997 e 2001 a 2006, SILVA & MUNIZ (2009) verificaram que no primeiro

período, 40,2% dos casos estavam relacionados com ocupações rurais e no segundo período, este percentual caiu para 17,9% dos casos.

No Brasil, estima-se que 3 a 5% dos pacientes com LC vão evoluir para LM, reforçando que a LM é secundária à LC (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS, 2006). Dos pacientes avaliados, 74,3% apresentavam LC e 25,7% apresentavam LM, dados estes concordantes com o estudo realizado no Mato Grosso do Sul, em que 68% dos pacientes apresentavam LC e 32% apresentavam LM (MURBACK et al., 2011). Estes dados mostram que na região Centro-Oeste há uma maior incidência de LM comparado às outras regiões do Brasil, que é em torno de 7% dos casos de LTA (SINAN/SVS/MS, 2010). Em um estudo realizado no estado do Paraná, 88,9% dos pacientes apresentavam LC e 11,1% apresentavam LM (CURTI et al., 2009), na cidade de Campinas/SP, 91,7% dos pacientes avaliados apresentavam LC (NASSER et al., 2009) e, Londrina/PR, apenas 4,5% dos casos reportados eram LM (PONTELLO et al., 2013).

O período de incubação da doença varia de acordo com a espécie infectante e a relação parasito-hospedeiro (WEIGLE & SARAVIA, 1996). As lesões cutâneas surgem de 18 dias a 3 meses após a infecção pelo parasito (AZULAY & SALGADO, 1966; PESSÔA & BARRETTO, 1948). Dos 88 pacientes com LC avaliados em relação ao tempo de evolução da lesão, 85,3% apresentaram a lesão entre 15 dias e 6 meses de infecção, com uma mediana de três meses. Já as lesões mucosas são, geralmente, secundária à lesão cutânea, como consequência de uma LC crônica, curada sem tratamento ou com tratamento inadequado (CAMUSET et al., 2007; GONTIJO & DE CARVALHO, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Estas lesões segundo observado por HERWALDT (1999) podem aparecer de dias a décadas após a LC. No presente estudo, dos pacientes que apresentaram LM e relataram o tempo de aparecimento da lesão, 40% (N=12) apresentaram a lesão em até 2 anos após a infecção, 30% (N=9) apresentaram a lesão com mais de 5 anos após a infecção e 60% apresentaram cicatriz sugestiva de LTA. Destes, 50% apresentaram LM em até 2 anos. Em um estudo realizado no Paraná, 76% dos pacientes com LM apresentam cicatriz sugestiva de LC anterior (CURTI et al., 2009). É possível que muitos casos de LC, no momento do diagnóstico das

lesões primárias, já apresentam alterações nasais. E a identificação destes casos mostra a importância da avaliação de rotina da mucosa nasal em todos os pacientes com LC (BOAVENTURA et al., 2006).

Para diagnóstico de LTA dos pacientes atendidos no ambulatório de endemias do HDT/GO foram analisados os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Entre os critérios laboratoriais, os testes parasitológicos são considerados os métodos de primeira escolha por serem de menor custo e fácil execução (GONTIJO & DE CARVALHO, 2003). No presente estudo, o exame direto (ED) e análise histopatológica (AH), tiveram uma positividade de 70,6% e 80,9% respectivamente. A alta positividade encontrada na AH neste estudo está de acordo com outro estudo realizado por OLIVEIRA et al. (2010) em pacientes atendidos no HDT/GO, que foi de 83,3%. Entretanto, a detecção dos parasitos em AH em pacientes com baixa carga parasitária ou que estão na fase crônica da doença é difícil, já que podem ser confundidos com inflamação crônica, inespecífica e/ou reação granulomatosa (AMATO et al., 1998; SHIRIAN et al., 2014). Os testes imunológicos, IRM, IFI e ELISA, tiveram uma positividade de 68,9%, 44,2% e 73% respectivamente. OLIVEIRA et al. (2010) detectaram positividade similar, sendo de 58,8% para a IRM e 47,3% para IFI. Uma positividade similar também foi detectada por FERREIRA et al. (2006), que foi de 64,4% para IRM, 58,1% para IFI e 85% para o ELISA. Neste estudo, todos os pacientes com LM apresentaram, na IRM, uma enduração maior ou igual a 10 mm, confirmando os relatos do MINISTÉRIO DA SAÚDE (2009), em que os pacientes com LM apresentam uma IRM exacerbada. Além disso, não foi observada uma relação entre a faixa etária dos pacientes e a positividade da IRM. Isto se deve ao fato de que em áreas endêmicas, é frequente encontrar reatividade à IRM em indivíduos sem lesão característica de LTA, o que pode significar uma infecção subclínica (SAMPAIO et al., 2009).

O teste sorológico, que detecta anticorpos anti-*Leishmania* circulantes no sangue dos pacientes com LTA, recomendando pela OMS, a IFI, apresentou uma baixa positividade comparada ao ELISA, além de apresentar, segundo relatos da literatura, baixa reprodutibilidade e reação cruzada com outras patologias, como doença de Chagas, Leishmaniose visceral, esporotricose, entre outras (EDRISSIAN & DARABIAN, 1979; MANCIANTI et al., 1995). Assim,

a técnica de ELISA, além de ser uma técnica que pode ser automatizada e utilizada em larga escala, ela apresentou uma especificidade de 95% e uma maior positividade na população estudada em relação aos outros testes imunológicos, podendo ser considerada um método complementar para diagnóstico da LTA.

A mensuração dos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* têm sido usada como diagnóstico e estes tem mostrado estarem correlacionados com a gravidade da doença (CASTELLANO et al., 2009). A concentração de anticorpos podem variar de acordo com a carga parasitária (GUTIERREZ et al., 1991), duração da infecção (PEREIRA et al., 2012), espécies de *Leishmania* e fatores do hospedeiro (MILES et al., 2005). No presente trabalho, a detecção de IgG específica para antígenos de *L. (V.) braziliensis* ocorreu em 69% dos pacientes com LC e 84,7% dos pacientes com LM, tendo uma diferença estatística significativa entre os dois grupos ($P < 0,05$). Estes dados estão de acordo com os encontrados por JUNQUEIRA PEDRAS et al. (2003). Os níveis elevados de IgG anti-*Leishmania* em pacientes com LM está relacionado com a longa duração da doença e SARAIVA et al. (1989) demonstraram que lesões crônicas e graves estão relacionadas a resposta imune aumentada.

A LTA é de difícil prognóstico e uma avaliação dos níveis de IgG anti-*Leishmania* é importante para o acompanhamento clínico pós-terapia (FAGUNDES-SILVA et al., 2012). Tem sido sugerido que a diminuição dos níveis destes anticorpos nos pacientes com LTA após o tratamento pode ser um método para monitorar a cura pós-terapêutica (MENDONÇA et al., 1988), indicando o controle da infecção. Acredita-se que presença destes anticorpos após o tratamento poderia indicar a persistência do parasito, sendo um fator preditivo de recorrência da LTA (FAGUNDES-SILVA et al., 2012; PEREIRA et al., 2012). Considerando que LM está associada a altos níveis de IgG anti-*Leishmania*, nos pacientes com LC a persistência de altos níveis de anticorpos específicos poderia ser um marcador de prognóstico e poderia indicar uma suscetibilidade maior para o desenvolvimento de LM (ROMERO et al., 2005). Com o objetivo de acompanhar as variações das concentrações séricas de IgG específicas para o antígeno de *L. (V.) braziliensis* e avaliar por quanto tempo após o tratamento terapêutico o paciente deve ser monitorado, os soros de

todos os pacientes, do presente estudo, que retornaram 3, 6, 12 e/ou 18 meses após o início do tratamento foram avaliados. Verificamos que dos 55 pacientes com LC avaliados antes e após o tratamento, apenas 5 mantiveram altos níveis de IgG anti-*Leishmania* após o tratamento, e todos eles apresentaram a cura clínica.

Os pacientes avaliados, em relação à detecção de níveis de IgG específicos para o extrato total de *L. (V.) braziliensis* após 3 meses de tratamento, não tiveram uma diferença estatística significativa. Foi observada uma diferença estatística significativa apenas entre os pacientes com LC que retornaram 6 e 18 meses após o tratamento. A diferença estatística não significativa após 12 meses de tratamento pode ser atribuída ao pequeno número de pacientes acompanhados.

Nos pacientes com LM, não foi encontrada uma diferença estatística significativa após o tratamento, em relação à detecção de níveis de IgG específicos para o extrato total de *L. (V.) braziliensis*, nem após 18 meses de acompanhamento, mesmo apresentando cura clínica. Entretanto, o mesmo não foi observado por JUNQUEIRA PEDRAS et al. (2003) que demonstraram uma redução significativa dos níveis de IgG específicas para o antígeno de *L. (V.) braziliensis*, em pacientes com LM, após 6 meses de tratamento. Por outro lado, PEREIRA et al. (2012) não detectaram diferença estatística entre os níveis de IgG anti-*Leishmania* após o tempo de tratamento utilizando citometria de fluxo em pacientes com LTA. Entretanto, LEMOS et al. (2007) analisaram pacientes com LV 2, 6 e 12 meses após o tratamento e demonstraram diminuição dos níveis de IgG anti-*Leishmania* após 6 e 12 meses de tratamento.

É importante a identificação das espécies envolvidas nos casos de LTA em áreas endêmicas, pois espécies diferentes de *Leishmania* estão relacionadas a diferentes infectividade, patogenicidade, prognóstico da doença e conduta terapêutica. Neste trabalho, as espécies de leishmânias envolvidas na infecção dos pacientes atendidos no HDT/GO foram identificadas, utilizando a técnica da PCR-RFLP. Esta técnica apresenta alta sensibilidade e especificidade, sendo capaz de detectar baixa quantidade de parasitos na lesão e permite utilizar pequenas amostras de material (WEIGLE et al., 2002). Foi

identificado *L. (V.) braziliensis* como principal espécie prevalente no estado de Goiás, em 93,5% dos casos. Em Pernambuco, REIS et al. (2008) relataram que a única espécie circulante de leishmânia na região, responsável pela LTA, era a *L. (V.) braziliensis*. No Paraná, 98,7% das espécies identificadas eram de *L. (V.) braziliensis* e apenas 1,3% era de *L. (L.) amazonensis* (SILVEIRA et al., 1999). Em Minas Gerais, a espécie predominante na região também é a *L. (V.) braziliensis* (PASSOS et al., 1999), assim como nos estados do Rio de Janeiro (CARVALHO et al., 2013), Pará (BACHA et al., 2011), Espírito Santo (FALQUETO et al., 2003) e Bahia (JIRMANUS et al., 2012). Com isto, a *L. (V.) braziliensis* é a espécie mais prevalente no Brasil.

Os resultados do presente estudo reforçam que, a LTA é uma zoonose de crescente distribuição na região Centro-Oeste, assim como no Brasil, sendo um problema de saúde pública e com características clínico-epidemiológicas, de diagnóstico, tratamento e controle complexas. No seu conjunto, há necessidade de realizar o diagnóstico precoce, utilizando técnicas mais sensíveis, e identificar as espécies responsáveis pela doença para a elaboração de prognósticos precisos e terapia adequada, evitando o aparecimento de novas lesões e a progressão da doença.

Os dados do acompanhamento sorológico dos pacientes com LTA antes e após o tratamento indicam que os níveis de IgG total tendem a diminuir após 6 meses de tratamento. Esta informação é relevante, podendo estar associada a um bom prognóstico e melhora clínica da doença. Diante do exposto, sugere-se a avaliação com um maior número de pacientes, principalmente após 12 meses de tratamento.

7 CONCLUSÕES

a) Baseado nos dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com LTA, provenientes da região Centro-Oeste, atendidos no HDT/GO de 2000 a 2006:

- ✓ 74,3% eram do sexo masculino.
- ✓ 54,6% tinham entre 30 e 59 anos.
- ✓ 81,6% adquiriram a infecção no estado de Goiás e 18,4% no Mato Grosso.
- ✓ 10,6% adquiriram a infecção em atividades de lazer como caça, pesca ou acampamento e 48,7% adquiriram durante o trabalho em área rural, sugerindo que o ciclo da *Leishmania* ainda se mantém nas margens dos rios, córregos e áreas de desmatamento da região.
- ✓ 74,3% apresentavam leishmaniose cutânea (LC) e 25,7% apresentavam leishmaniose mucosa (LM).
- ✓ 84,3% dos pacientes com LC apresentaram a lesão no máximo 6 meses após a infecção.
- ✓ 60% dos pacientes com LM apresentaram cicatriz sugestiva de LTA.

b) Baseado nos dados imunológicos e laboratoriais dos pacientes com LTA:

- ✓ A técnica de ELISA teve uma positividade de 73,0%, sendo maior que a da IFI, que é o método recomendado pelo Ministério da Saúde, que foi de 44,2%.
- ✓ Antes do tratamento foi detectada IgG específica contra antígenos de *L. (V.) braziliensis* em 84,7% dos pacientes com LM e 69,0% dos pacientes com LC, tendo uma diferença estatística significativa entre os dois grupos.

- ✓ Após 6 e 18 meses do início do tratamento, nos pacientes com LC, a detecção de IgG específica contra antígenos de *L. (V.) braziliensis* diminuiu significativamente.
- ✓ Nos pacientes com LM, após o início do tratamento, os níveis de anticorpos séricos de IgG específica contra antígenos de *L. (V.) braziliensis* não sofreu alteração significativa.
- ✓ 93,5% das amostras caracterizadas por PCR foram de *L. (V.) braziliensis*.

8 REFERÊNCIAS

- Amato, V. S. et al. An evaluation of clinical, serologic, anatomopathologic and immunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 40(1): 23–30, 1998.
- Amato, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 23(9): 1026–34, 2009.
- Ameen, M. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: emerging therapies and progress in disease management. *Expert opinion on pharmacotherapy* 11(4): 557–69, 2010.
- Aragão, H. B. Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. *Brasil Médico* 36: 129–130, 1922.
- Azulay, R. D.; Salgado, U. Surto epidêmico da leishmaniose tegumentar em para-quedistas do Exército no Amazonas. *Med Cutânea* 1: 347, 1966.
- Bacellar, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and immunity* 70(12): 6734–40, 2002.
- Bacha, H. A et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* identification by PCR in the state of Para, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105 (3): 173–178, 2011.
- Barbosa, W.; Silva, M. R.; Borges, P. C. Informe preliminar sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana em Goiás. *Revista Goiana de Medicina*, p. 11, 1965.
- Belkaid, Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert opinion on biological therapy* 3,(6): 875–885, 2003.
- Benicio, E. D. A. et al. Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of *Leishmania (V.) guyanensis*. *Anais brasileiros de dermatologia* 86(6):1141–4, 2011.
- Blackwell, J. M. Leishmaniasis epidemiology: all down to the DNA. *Parasitology* 104:19–34, 1992.

- Boaventura, V. S. et al. Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 75(2): 267–269, 2006.
- Brito, M. E. F. et al. Identification of Potentially Diagnostic *Leishmania braziliensis* Antigens in Human Cutaneous Leishmaniasis by Immunoblot Analysis. *Clinical and vaccine immunology* 7: 7–11, 2000.
- Camuset, G. et al. Mucocutaneous leishmaniasis in Brazilian Amazonia. *Médecine et maladies infectieuses* 37(6): 343–346, 2007.
- Carvalho, B. M. et al. Leishmaniasis transmission in an ecotourism area: potential vectors in Ilha Grande, Rio de Janeiro State, Brazil. *Parasites & vectors* 6(1): 325, 2013.
- Carvalho, G. M. L. et al. Study of phlebotomine sand flies (*Diptera: Psychodidae*) collected in a *Leishmania*-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. *Journal of medical entomology* 47(6): 972–6, 2010.
- Castellano, L. R. et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Human immunology* 70(6): 383–90, 2009.
- Curti, M. C. DE M. et al. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana na região Noroeste do Estado do Paraná. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 30(1): 63–68, 2009.
- De Andrade, R. A. et al. Clinical value of anti- *Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. *Veterinary immunology and immunopathology* 116(2): 85–97, 2007.
- De Brito, M. E. et al. Clinical epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality , Greater Metropolitan Recife , Pernambuco State , Brazil. *Caderno de Saúde Pública Rio de Janeiro* 24(10): 2445–2448, 2008.
- De Magalhães, A. V et al. Histopathology of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. Padrões histológicos e estudo evolutivo das lesões. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 28(6): 421–30, 1986.
- Disch, J. et al. *Leishmania (Viannia)* subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 51(3): 185–90, 2005.
- Dutra, W. O. et al. Immunoregulatory and Effector Activities in Human Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis: Understanding Mechanisms of Pathology. *Drug development research* 72(6): 430–436, 2011.
- Edrissian, G. H.; Darabian, P. A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test in the serodiagnosis of cutaneous

and visceral leishmaniasis in Iran. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73(3): 289–292, 1979.

Fagundes-Silva, G. A et al. Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite immunology* 34(10): 486–491, 2012.

Falqueto, A. et al. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (8): 1003–1010, 2003.

Ferreira, M. G. P. A. et al. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Veterinary parasitology* 165: 150–154, 2009.

Ferreira, M. P. et al. Sensitivity of an immunoenzymatic test for detection of anti-*L. brasiliensis* antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48(4): 215–217, 2006.

Filho, H. Human Leishmaniasis correlation with savannah of Goiás. *Universidade de Ciências da Saúde de Brasília* 2(1): 111–116, 2004.

Floch, H. *Leishmania tropica guyanensis*, cause of cutaneous leishmaniasis in the Guianas and Central America. *Institut Pasteur de la Guyane française et de l'Inini* 15(328): 1–4, 1954.

França, E. L. et al. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Juína, Mato Grosso, Brasil. *Scientia Medica* 19: 103–107, 2009.

Galati, E. A. B. et al. Estudo dos flebotomíneos (*Diptera*, *Pychodidae*), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 30(2): 115–128, 1996.

Gomes, A. D. C. Flebotomíneos de Londrina, Paraná (Brasil) e observações ecológicas sobre algumas espécies. *Revista de Saúde Pública*, 1977.

Gomes, A. H. S. et al. *Leishmania (V.) braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Experimental parasitology* 119(3): 319–324, 2008.

Gontijo, B.; De Carvalho, M. De L. R. American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(1): 71–80, 2003.

Goto, H.; Lindoso, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert review of anti-infective therapy* 8(4): 419–433, 2010.

Green, S. J. et al. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of immunology* 144(1): 278–83, 1990.

Grimaldi, G.; Tesh, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical microbiology reviews* 6,(3): 230–50, 1993.

Guimarães, M. C. et al. Seroepidemiology of cutaneous leishmaniasis from Ribeira do Iguape Valley. IgM and IgG antibodies detected by means of an immunoenzymatic assay (ELISA). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 25(3): 108–112, 1983.

Gutierrez, Y. et al. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 45(3): 281–289, 1991.

Heinzel, F. P. et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *The Journal of experimental medicine* 169(1): 59–72, 1989.

Herwaldt, B. L. Leishmaniasis. *Lancet* 354(9185): 1191–1199, 1999.

Jirmanus, L. et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 86(3): 426–433, 2012.

Junqueira Pedras, M. et al. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 47(3): 477–485, 2003.

Lainson, R.; Shaw, J. J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *British medical bulletin* 28(1): 44–48, 1972.

Lainson, R.; Shaw, J. J. *Leishmania (Viannia) naiffi*, a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* in Amazonian Brazil. *Annales de parasitologie humaine et comparée* 64(1): 3–9, 1989.

Lainson, R.; Shaw, J. J.; Silveira, F. T. Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81(4): 702–3, 1987.

Laskay, T.; Van Zandbergen, G.; Solbach, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology* 213: 183–191, 2008.

- Lemos, E. M. et al. Detection of Anti-*Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* Immunoglobulin G by Flow Cytometry for Cure Assessment following Chemotherapeutic Treatment of American Visceral Leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology* 14(5): 569–576, 2007.
- Lessa, M. M. et al. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Brazilian journal of otorhinolaryngology* 73(6): 843–7, 2007.
- Liew, F. Y. et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of immunology* 144(12): 4794–7, 1990.
- Liew, F. Y.; O'Donnell, C. A. Immunology of leishmaniasis. *Advances in parasitology* 32: 161–259, 1993.
- Major, B.; Ross, R. Further Notes on Leishmans's Bodies. The Etiology of One of the Heterogeneous Fevers of India. *Journal of Medical British* 2: 1903, 1903.
- Mancianti, F. et al. Comparison between an enzyme linked immunosorbent assay using a detergent soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology* 59(1): 13–21, 1995.
- Marcussi, V. M. et al. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: New primers for identification using polymerase chain reaction. *Experimental parasitology* 120(4): 300–305, 2008.
- Marques, M. J. et al. Simple form of clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 65(6): 902–906, 2001.
- Martins, L. M. et al. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Buriticupu , Amazônia do Maranhão , Brasil , 1996 a 1998. *Caderno de Saúde Pública Rio de Janeiro* 20(3): 735–743, 2004.
- Marzochi, M. C. A. Doenças Infecto-Parasitárias. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina* 63: 82–104, 1992.
- Matthews, D. J. et al. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *Journal of immunology* 164(3): 1458–62, 2000.
- Mendonça, S. C. et al. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83(3): 347–55, 1988.
- Miles, S. A et al. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *The Journal of experimental medicine* 201(5): 747–754, 2005.

Ministério da Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2^o ed. Brasília, 2007.

Ministério da Saúde. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 7^aed. Brasília, DF, Caderno 11, 2009.

Ministério da Saúde/SVS. *Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília, DF, 2006.

Montenegro, J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Archives of Dermatology and Syphilis* 13: 187–184, 1926.

Murback, N. D. N. et al. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 86(1): 55–63, 2011.

Nasser, J. T.; Donalisio, M. R.; Vasconcelos, C. H. Spatial distribution of American tegumentary leishmaniasis cases in Campinas, State of São Paulo, between 1992 and 2003. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42(3): 309–14, 2009.

Neves, D. *Parasitologia Humana*. 12. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2011.

Nonose, G.; Eugenia, M.; Ferreira, M. C. Considerações sobre a dispersão da Leishmaniose Tegumentar Americana nas Américas. v. 1: 85–103, 2009.

Oliveira, M. A. P. De et al. *Leishmania* spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 52(2): 83–8, 2010.

Passos, V. M. et al. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta tropica* 72(3): 251–8, 1999.

Pereira, V. R. A. et al. Evaluation of anti-lived and anti-fixed *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 74(3): 292–8, 2012.

Pessôa, S. B.; Barretto, M. P. *Leishmaniose Tegumentar Americana*. Ministério da Educação e Saúde. Rio de Janeiro p. 527, 1948.

Peters, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321(5891): 970–4. 2008.

Pirmez, C. et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *The Journal of clinical investigation*, 91(4): 1390–5, 1993.

Pissinate, J. F. et al. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-Leishmania immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Journal of immunological methods* 336(92): 193–202, 2008.

Pontello, R.; Gon, A. D. S.; Ogama, A. American cutaneous leishmaniasis: epidemiological profile of patients treated in Londrina from 1998 to 2009. *Anais brasileiros de dermatologia* 88(5): 748–753, 2013.

Reis, L. D. C. et al. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41(5): 439–43, 2008.

Rey, L. *Parasitologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

Ribeiro-De-Jesus, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian journal of medical and biological research* 31(1): 143–8, 1998.

Rocha, R. D. R. et al. Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. *Tropical medicine & international health* 11(2): 156–66, 2006.

Romero, G. A. S. et al. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta tropica* 93(1): 49–56, 2005.

Sacks, D.; Noben-Trauth, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature reviews. Immunology* 2(11): 845–58, 2002.

Salay, G. et al. Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Clinical and vaccine immunology* 14(9): 1173–81, 2007.

Sampaio, N. R. R. et al. Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42(6): 686–690, 2009.

Sanofi Aventis. *MT é o 5º estado brasileiro em casos de leishmaniose*. Disponível em: <<http://www.mutumnoticias.com.br/editorias/saude/mt-e-o-5-estado-brasileiro-em-casos-leishmaniose>>. Acesso em: 6 abr. 2014.

Saravia, N. G. et al. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases* 159(4): 725–35, 1989.

Scott, P. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Experimental parasitology* 68(3): 369–72, 1989.

Scott, P.; Scharon, T. Interaction between the innate and the acquired immune system following infection of different mouse strains with *Leishmania major*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 730: 84–92, 1994.

Sharma, U.; Singh, S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian journal of experimental biology* 47(6): 412–23, 2009.

Shaw, J. J. et al. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) shawi*, in Pará State, Brazil. *Annales de parasitologie humaine et comparée*, 66(6): 243–6, 1991.

Shaw, J. J.; Lainson, R. Leishmaniasis in Brazil. Observations on the seasonal variations of *Lutzomyia flaviscutellata* in different types of forest and its relationship to enzootic rodent leishmaniasis (*Leishmania mexicana amazonensis*). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 66,(5): 709–17, 1972.

Shaw, J. J.; Lainson, R. The in vitro cultivation of members of the *Leishmania braziliensis* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 75(1): 127, 1981.

Shirian, S. et al. Comparison of conventional, molecular, and immunohistochemical methods in diagnosis of typical and atypical cutaneous leishmaniasis. *Archives of pathology & laboratory medicine* 138(2): 235–40, 2014.

Silva, N. S. Da; Muniz, V. D. Epidemiology of American tegumentary leishmaniasis in the State of Acre, Brazilian Amazon. *Cadernos de saúde pública* 25(6): 1325–36, 2009.

Silveira, F. T. et al. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni*, a new parasite from the State of Pará. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 82(2): 289–91, 1987.

Silveira, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology* 31(8): 423–31, 2009.

Silveira, T. G. et al. The laboratory diagnosis and epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Paraná State, southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32(4): 413–23, 1999.

SINAN/SVS/MS. *Relatório Situação Goiás*. v. 1: 10, 2005.

SINAN/SVS/MS. *Relatório Situação Goiás*. v. 3: 10, 2007.

SINAN/SVS/MS. *Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública* 2: 1–24, 2010.

SINAN/SVS/MS. *Relatório de Situação Mato Grosso*. 5ed. ed. Brasília, DF: . p. 17, 2011

SINAN/SVS/MS. *Relatório de Situação Mato Grosso do Sul*. 5ed. ed. Brasília, DF: . p. 16, 2011

SINAN/SVS/MS. *Relatório de Situação Goiás*. 5ed. ed. Brasília DF. p. 16, 2011

SINAN/SVS/MS. *Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net*. Disponível em: <www2.datasus.gov.br>. Acesso em: 17 fev. 2014.

Singh, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *The Indian journal of medical research* 123(3): 311–30, 2006.

Furtado, T. Critérios para diagnóstico de LTA. *Anais brasileiros de dermatologia* 65: 51–86, 1980.

Tuon, F. F. et al. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis. *International journal of dermatology* 47(2): 109–24, 2008.

VIDIGAL, C. D. P. et al. Enzyme immunoassay using *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigens for laboratorial diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Acta tropica* 107(2): 208–12, 2008.

Volpini, Â. C. et al. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 90(1): 31–37, 2004.

Walton, B. C.; Shaw, J. J.; Lainson, R. Observations on the in vitro cultivation of *Leishmania braziliensis*. *The Journal of parasitology* 63(6): 1118–9, 1977.

Weigle, K. A. et al. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 36(3): 489–96, 1987.

Weigle, K. A. et al. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *Journal of clinical microbiology* 40(2): 601–6, 2002.

Weigle, K.; Saravia, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. *Clinics in dermatology* 14(5): 433–50, 1996.

World Health Organization. *Tropical Diseases Research (TDR). Leishmaniasis disease information*. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/info/en/index.html>>. Acesso em: 25 jan. 2013a.

World Health Organization. *Leishmaniasis: Situation and trends*. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/index.html>. Acesso em: 12 dez. 2013b.

World Health Organization. *Leishmaniasis: Number of cases of cutaneous leishmaniasis reported by country*. Disponível em: <<http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHCNUM?lang=en>>. Acesso em: 12 dez. 2013c.

Zauli-Nascimento, R. C. et al. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Tropical medicine & international health* 15(1): 68–76, 2010.

ANEXO 1



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
Goiânia, 10/12/2004.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA,
PROTOCOLADO NESTE COMITÊ SOB O Nº: 125/2004.

Título: *Banco Imunobiológico das Leishmanioses da Região Centro Oeste (Leishbank) e subprojetos associados.*

Pesquisador (a) Responsável: *Miriam Cristina Leandro Dorta.*

Instituições onde será realizado o estudo: *Laboratório de Imunobiologia das leishmanioses do Departamento de micro, imuno, parasito e patologia do Instituto de Patologia Tropicais e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás/GO; Ambulatório de leishmaniose do Hospital Anuar Auad (HDT/Goiânia/GO) e Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás/GO.*

Apresentado ao CEPMHA/HC/UFG: *25/11/2004*

Relator: *Prof. Dr. Marcelo Medeiros.*

DOCUMENTOS RECEBIDOS:

O presente protocolo se enquadra no Grupo III. O Pesquisador responsável *não* necessita aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, sendo necessário apenas o envio de relatórios trimestrais.

COMENTÁRIOS:

- a) Objetivo Geral do Projeto: *Criar um banco de leishmanias isoladas de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana ou Visceral e estocar*

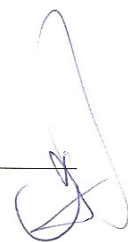
1ª Avenida, s/nº, Setor Leste Universitário - Goiânia - Goiás
CEP: 74 605 - 050 - Fone: (0xx62) 261 30 06 - Fax : (0xx62) 261 29 91

materiais biológicos dos pacientes com suspeita da doença, incluindo biópsias, sangue total, soro e células purificadas. Todo o material armazenado no banco será utilizado exclusivamente para pesquisas de caracterização dos parasitos, interações parasitos-células hospedeiras e avaliação das imunidades inata, humoral e celular dos hospedeiros. Estes estudos visam a identificação de antígenos candidatos a melhorar a eficiência de vacinas, além de melhorias no diagnóstico e acompanhamento da doença.

- b) Objetivos Específicos do Projeto: a) Isolar e caracterizar molecularmente as espécies/isolados de Leishmanias da Região Centro Oeste; b) Avaliar o comportamento de diferentes espécies/isolados de Leishmania prevalentes na região Centro-Oeste com relação às respostas das células do sistema imune e a evolução clínica da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e da Visceral; c) Identificar moléculas alvo para imunização experimental de animais de laboratório contra LTA, incluindo a imunização genética; d) Avaliar antígenos preparados com as espécies/isolados de Leishmanias em testes in vivo em animais de laboratório (Reação Intradérmica de Montenegro) e in vitro (células humanas e murinas), comparando com antígeno padrão nacional e com antígenos preparados com cepas de referência da OMS; e) Estudar os aspectos clínicos, imunológicos, epidemiológicos, de diagnóstico e de tratamento dos pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana ou Visceral, provenientes da região Centro-Oeste, incluindo a leishmaniose em assentamentos de trabalhadores rurais do Movimento Sem Terra no Estado de Goiás.*

Sangue de indivíduos não infectados com leishmania será obtido no Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da UFG. O soro e as células destes indivíduos serão estocadas sem a identificação do doador. O Termo de Consentimento utilizado será o mesmo do Banco de Sangue, no qual o doador doa até 500ml de sangue.

Sumario do projeto:

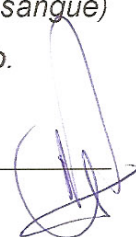


EM ACORDO COM A RESOLUÇÃO 196/96, O PRESENTE PROTOCOLO ESTÁ:

- a) Quanto ao preenchimento da folha de rosto: *Estudo a ser realizado – em parte – no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC/UFG), mais especificamente no Banco de Sangue. Outra etapa da pesquisa será realizada no Hospital Anuar Hadad (HDT) em Goiânia.*
- b) Quanto à estrutura do Protocolo: *O protocolo apresenta aspectos descritivos da pesquisa com as respectivas informações aos sujeitos e os pesquisadores têm qualificação condizente à proposta de estudo a qual tem apoio financeiro do CNPq.*
- c) Quanto à justificativa de uso de placebo: *Não se aplica.*
- d) Quanto à justificativa de suspensão terapêutica (wash-out): *Não se aplica.*
- e) Quanto aos riscos e benefícios: *A responsável apresenta apenas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que a “avaliação do risco da pesquisa é mínimo”.*
- f) Quanto ao retorno de benefícios para o sujeito e ou para a comunidade: *Não foram apresentados, mas entendo que está implícito em uma frase do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: “Os resultados obtidos poderão acrescentar informações importantes no conhecimento da doença, que poderá beneficiar no futuro todas as pessoas que estão expostas à Leishmaniose.*

QUANTO A ADEQUAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E FORMA DE OBTÊ-LO:

- a) Linguagem: *Objetiva, trazendo informações suficientes para que o sujeito possa decidir sobre sua participação ou não na pesquisa.*
- b) Justificativa, objetivos e procedimentos: *Foram apresentados devidamente.*
- c) Desconfortos e riscos: *Os procedimentos invasivos (biópsia e coleta de sangue) são devidamente especificados e justificada a sua importância no processo.*
- e) Métodos alternativos existentes: *Não foram apresentados*



Descrição e caracterização da amostra (população alvo): Serão incluídos no estudo todos os pacientes recebidos no Hospital Anuar Auad (HDT), situado em Goiânia (GO), com suspeita de LTA ou LV, com faixa etária entre 07 e 65 anos, no período de maio de 2004 a junho de 2014. Também serão incluídos todos os pacientes, identificados através de triagem, pelos médicos do HDT em acampamento do MST em Goiás. Após o diagnóstico clínico e epidemiológico, serão colhidos raspados da lesão, biópsias das lesões (5mm) e sangue endovenoso (5ml). O material é fundamental para um diagnóstico mais preciso da doença no paciente e posterior tratamento.

Critério de Inclusão e Exclusão: Somente serão incluídos como sujeitos do estudo (1) aqueles pacientes que tiverem resultado positivo para o parasito e concorde em participar da pesquisa. Nestes serão colhidos 10 ml de sangue ao invés dos 5ml utilizados no diagnóstico, exceto quando não for recomendada a retirada deste sangue adicional. Os blocos de parafina serão armazenados no Leishbank do Laboratório de Imnobiologia das Leishmanioses. Os parasitos dos que concordarem e não concordarem serão estocados no banco. Mas nenhum material biológico dos que não concordarem serão estocados.

Adequação da Metodologia: O projeto propõe uma pesquisa de abordagem experimental, englobando etapas específicas desde o diagnóstico clínico, laboratorial parasitológico e isolamento de parasitos; avaliação do comportamento das diferentes espécies/isolados de *Leishmania* "in vitro" e "in vivo", avaliação da imunidade inata e da imunidade celular; resposta humoral; e caracterização dos genes de *L. (V.) brasiliensis* que codificam as proteínas similares aos antígenos LACK, TSA, LMSTI1 e LEIF de *L. (L.) major*; amplificação e purificação dos genes das espécies de *L. (V.) brasiliensis*.

Adequação das condições: Não informado.

ANEXO 2

**INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA/UFG
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA, PARASITOLOGIA E
PATOLOGIA**

Rua Delenda Rezende de Melo – S/N – Setor Universitário – 74605-050 – Goiânia – Goiás
Tel. (062) 261-6497 – Ramal 218 – Fax: 202 – 3066

HOSPITAL ANUAR AUAD (HDT)/SES

Av. Contorno S/N – Jardim Bela Vista – 74853-400 – Goiânia – Goiás

TERMO DE CONSENTIMENTO

Projeto: “Epidemiologia Molecular de Leishmaniose tegumentar Americana (LTA) e Avaliação da Resposta Imunológica de Pacientes com Leishmaniose na Região Centro Oeste.”

Pelo presente termo de consentimento, manifesto voluntariamente minha concordância em participar do estudo acima intitulado. Foram-me informados todos os procedimentos relacionados à minha participação neste estudo, os quais consistem em realização de exame clínico, coleta de amostras no local da lesão de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), através de biópsia e aspiração subcutânea no bordo da lesão, aplicação do teste de intradermoreação de Montenegro para diagnóstico imunológico da LTA, coleta de sangue para avaliação da resposta imunológica contra o parasito.

Os exames serão realizados antes do início do tratamento e após 3, 6, 12 e 18 meses.

As implicações relacionadas à minha participação neste estudo foram bem esclarecidas pela equipe responsável.

Tive oportunidade e fui incentivado a pedir qualquer esclarecimento adicional pela que julgasse necessário, sobre qualquer questão relacionada à minha participação no estudo, e cada uma destas questões foi esclarecida pela equipe.

Estou certo que os resultados e conclusões obtidas pelo desenvolvimento deste estudo, poderão contribuir para o melhor conhecimento da LTA e, conseqüentemente, para suportar a adoção de novas medidas para o seu efetivo controle.

Minha privacidade será garantida quando das publicações científicas oriundas deste estudo.

Nome do paciente

de 2000

Local e data

Responsáveis pela pesquisa: Dra. Miriam C. Leandro Dorta
Ms. Ledice Inácia

ANEXO 3

Sopa Primitiva 8%

Bis-acrilamida 30%	26,7 mL
TBE 5x	20 mL
Água milli Q	43,3 mL

TBE 5x

Tris Base	54g
Ácido Bórico	27,5mL
EDTA 0,5M pH=8	20mL
Água milli Q qsp	1000mL