

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Saúde Pública

LEÍLA INÊS DE AGUIAR RAPOSO DA CÂMARA COELHO

**CARACTERIZAÇÃO DE *Leishmania* spp. EM
AMOSTRAS ISOLADAS DE PACIENTES
PORTADORES DE LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA EM ÁREA
ENDÊMICA DA REGIÃO NORTE, BRASIL**

RECIFE
2010

LEÍLA INÊS DE AGUIAR RAPOSO DA CÂMARA COELHO

**CARACTERIZAÇÃO DE *Leishmania spp* EM AMOSTRAS ISOLADAS DE
PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
EM ÁREA ENDÊMICA DA REGIÃO NORTE, BRASIL**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho, PhD

Recife

2010

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

C672c Coelho, Leíla Inês de Aguiar Raposo da Câmara.

Caracterização de *Leishmania spp* em amostras isoladas de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da região Norte, Brasil/ Leíla Inês de Aguiar Raposo da Câmara Coelho. — Recife: L. I. A. R. C. Coelho, 2010.

108 f.: il., tabs.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho

1. Leishmaniose. 2. Anticorpos Monoclonais. 3. Isoenzimas. 4. Leishmania. I. Brandão Filho, Sinval Pinto. II. Título.

CDU 616.993.161

LEÍLA INÊS DE AGUIAR RAPOSO DA CÂMARA COELHO

**CARACTERIZAÇÃO DE *Leishmania spp* EM AMOSTRAS ISOLADAS DE
PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
EM ÁREA ENDÊMICA DA REGIÃO NORTE, BRASIL**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Sinval Pinto Brandão Filho, PhD
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

Milena Paiva Cavalcanti, PhD
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

Waldir de Queiróz Balbino, PhD
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

Ângela Cristina Rapela Medeiros, PhD
Universidade de Pernambuco

Jorge Augusto de Oliveira Guerra, PhD
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

AGRADECIMENTOS

Dra. Marcilene Gomes Paes pelos ensinamentos, suporte intelectual através de sua experiência clínica, humana na realização do presente estudo.

A Mestre Maria Edileuza Felinto de Brito pelos ensinamentos, paciência, amizade, experiência de vida que muito me ajudou na elaboração deste estudo.

A Dra Maria Sandra Andrade pelas orientações, correções, amizade, desprendimento, disponibilidade e pela colaboração na elaboração deste trabalho,

Ao Dr Sinval Pinto Brandão Filho, pelos ensinamentos, conselhos e competência na orientação deste trabalho. Obrigada pela oportunidade em abrir as portas do seu laboratório e por toda atenção dispensada. Obrigada pelo incentivo e apoio constantes.

À querida técnica Maria Rita Teixeira da GELEIS/FMTAM, pela eficiência e amabilidade com que acolhe todos os alunos, funcionários, mestrandos e doutorandos. Obrigada pela disponibilidade, atenção e agradáveis momentos de convivência.

Ao programa de Pós-Graduação em Saúde Pública do CPqLMD-Fiocruz da Amazônia na pessoa da sua atual coordenadora, Prof^a.Dra. Luiza Garnelo, pela oportunidade de aprendizado e pela competência em conduzir, com seriedade e sabedoria, os destinos do Programa junto à Fiocruz outros órgãos competentes.

À GELEISH, na pessoa do gerente da GELEISH, Dr Jorge A O Guerra, meu amigo

Aos técnicos e colegas de laboratório: Claudemir Félix, Angelina Amélia Bittencourt, Osmarina Oliveira, ao Sr Juracy Silva do INPA exemplos de dedicação e competência, lhes agradeço profundamente por todos os ensinamentos, pela paciência, confiança, atenção e auxílio. Obrigada pelo apoio, entusiasmo e incentivo constantes, pela oportunidade de aprendizado ao seus lados, não só em ciência, mas também pela experiência de vida compartilhada, tão nobres e rica, que vocês possuem. A vocês toda minha admiração em reconhecimento aos seus méritos.

A pesquisadora MSc Maria Edileuza Felinto de Brito, mais uma vez, por ter disponibilizado o laboratório para a realização das reações de PCR no primeiro momento deste trabalho e pelos ricos momentos de convivência, pela disponibilidade e esclarecimentos em alguns momentos deste trabalho.

A pesquisadora iniciante do CPqAM Bruna Lima pelo apoio na execução da técnica de PCR no Aggeu Magalhães por sua boa vontade, competência e presteza no nosso curto convívio.

Às minhas irmãs e amigas de sempre Lena e Lícia. Por todo apoio, todo companheirismo, toda amizade, carinho, conselhos e não poderia deixar de dizer, toda "intuição", que ainda continua bem em alta né?!. Vocês fazem parte das minhas escolhas e dos meus caminhos. A riqueza que construímos nesta vida de amizade inabalável é com certeza bem mais antiga do que pensamos... é por isso, amigas, que dedico também a vocês, com todo carinho e gratidão, minhas conquistas! Vocês são especiais e muito importantes para mim! A vocês toda minha gratidão, carinho e admiração!

Aos colegas de turma deste Doutorado, Adele, Ana Felícia Antonio Levino, Denise, Flavinha, Janete, José Maria Santana (Santaninha), Kátia, Marília, Maximiliano (Max), Marco Antonio, Mírcia, Nair e Regismeire, pelo companheirismo, carinho, e pelos agradáveis momentos de convivência vividos ao longo dessa jornada.

À minha mãe, *in memorium*, amada e querida, exemplo de perseverança e força, pelo apoio e amor incondicional, pelos preciosos conselhos, pela confiança e por compartilhar todos os momentos felizes e difíceis vividos ao longo de toda a vida. Você foi sempre será luz em minha vida. Não há palavra alguma que expresse a minha tamanha gratidão e amor por você. Eu te amo imensamente para sempre!

Ao meu infinitamente amado Pai, meu eterno ídolo, meu porto seguro, símbolo de sabedoria e paz e exemplo de bondade e candura,, te agradecem imensamente por todo apoio, preocupação, interesse, carinho e eterna boa vontade. Queria poder parar o tempo, eternizar na sua voz, seus conselhos e conversar com você sobre ciência e tudo mais, todos os segundos da minha vida. Você é inigualável. Obrigada pelos sábios conselhos. Eu amo muito você.

À "Bi", Juju e Cecel minhas vidas, exemplo de simplicidade e razões da minha verdadeira felicidade. Vocês alegram e coloreem todos os meus dias. Obrigada pelo esforço em compreender a minha ausência e muito obrigada por me esperarem sempre com o seu carinho e com seu abraço. Obrigada pelas alegrias que me trouxeram desde o dia que nasceram. A vocês todo o meu amor incondicional.

Ao meu marido Jesus, minha paixão e meu amor. Obrigada pela pureza de companheirismo que vivemos por sua luz que me alegra e me auxilia, pela alegria e

momentos felizes, pela preocupação, pelo carinho e pelo amor que me inspira, me aconchega enobrece os nossos dias. Você me completa! Te amo muito, pra sempre...

As minhas novas filhas Paulinha e Priscila pelos ensinamentos, companheirismo, admiração, alegria de viver...

E minha mais nova paixão Lucas que ainda vai me ensinar a compreender melhor a doce paixão às vezes insana das avós...

COELHO, Leíla Inês de Aguiar Raposo da Câmara. Caracterização de *Leishmania spp* em amostras isoladas de pacientes portadores de Leishmaniose tegumentar Americana em área endêmica da região Norte, Brasil. 2010. Tese (Doutorado em Ciências - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) na Amazônia Ocidental, Brasil, comporta-se, dentro do padrão de transmissão modificado do ponto de vista epidemiológico, pelos diversos fatores que influenciam no ciclo da doença. A ocorrência de casos vem aumentando nos últimos anos em Manaus, com frequência maior em áreas de assentamentos populacionais, notificados em média 600 casos/ano. Esse estudo tem como objetivo caracterizar as espécies de *Leishmania spp.* em amostras isoladas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da região norte, Brasil. Pacientes com leishmaniose tegumentar, procedentes de Manaus (61%), região metropolitana, do interior do estado do Amazonas, Pará, Roraima e Rondônia (39%) procuraram os serviços de ambulatório da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Um total de 209 pacientes submeteu-se aos exames clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Os exames parasitológicos foram realizados nos 209 pacientes através da técnica de escarificação de borda da lesão para a pesquisa direta; em 188 foi realizada punção aspirativa e em 21 biópsias para o isolamento do parasito em meios de cultura NNN/Schnneiders. Foi realizada a identificação e caracterização das espécies de *Leishmania spp* utilizando painel de anticorpos monoclonais e perfil de isoenzimas (MLEE). Dos 209 isolados 85% (178/209) foram positivas na pesquisa direta e se conseguiu isolamento por cultura de todas as amostras. Na caracterização os serodemas apresentaram maior frequência para *L. (V.) guyanensis* (73%) 153/209, zimodemas 83%(173/209). Em 13% (26/209) dos isolados apresentaram mais de uma espécie de parasitos, denominado de infecção mista. Nessas infecções a *L. (V.) guyanensis* estava presente na maioria dos isolados. O expressivo índice de infecções mistas evidenciado demonstra a grande diversidade de espécies de *Leishmania* associadas à doença nesta área endêmica da região norte. Esses achados podem contribuir no seguimento de tratamento, com a perspectiva de intervenção terapêutica mais eficaz para o paciente.

Palavras chaves: Leishmaniose. Anticorpos Monoclonais. Isoenzimas. *Leishmania*

COELHO, Leíla Inês de Aguiar Raposo da Câmara, Characterization of Leishmania in isolates from patients with Leishmaniasis Tegumentar American in endemic area on North region Brazil. 2010. Thesis (Doctorate in Public Health) - Research Center Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

ABSTRACT

American tegumentar leishmaniasis (ATL) in Western Amazon behave itself in a standard of transmission that have been changed in an epidemiological point of view, by many factors that influence the disease's cycle. The occurrence of cases has been increasing in the last few years in Manaus, in a greater frequency in areas of "populations' settlement", notifying, in average, 600 cases per year. This study has the objective to characterize the species of *Leishmania* spp in samples obtained from patients with ATL in the endemic area of North region in Brail. Patients with ATL from Manaus (61%), metropolis region, from the country side area of Amazonas state, Pará, Roraima and Rondônia (39%) have reached the Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. A total of 209 patients went under clinical, epidemiological and laboratorial exams. The parasitological exams were performed in the 209 patients by collecting material through "escarificação" in the edge of the lesion for direct observation; 188 the aspirative puncture and in 21 biopsy to isolate the parasite in "cultive medium: NNN and Schneider's. The identification and characterization of the species of *Leishmania* spp were done using a panel of monoclonal antibodies and isoenzyme profile (MLEE). From 209 samples 85% (178-209) was positive in the direct observation and all of them were isolated by culture. In the characterization the "serodemas" showed a greater frequency for *L. (V) guyanensis* (73%) 153-209, zimodemas 83% (173-209). In 13% (26-209) of the isolated shoed more than one species of parasites, calling mixed infection. In these infections *L. (V) guyanensis* were present in the majority of the species. The expressive rate of mixed infections shows the great diversity of species of *Leishmania* associated to disease in this endemic area from North region of the country. These findings may contribute in the treatment follow up with the perspective of therapeutic intervention more efficient for the patient.

Keywords: Leishmaniasis. Monoclonals antibodies. Isoenzymes. *Leishmania*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 --	Fêmea de flebotômíneo ingurgitada.....	19
Figura 2 -	Ciclo de transmissão da <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> na Amazônia brasileira.....	22
Figura 3 -	. Ciclo de transmissão da <i>L.(V.) guyanensis</i> na Amazônia brasileira	23
Figura 4 -	Ciclo de transmissão da <i>L. (V.) braziliensis</i> entre <i>Lutzomyia wellcomei</i> e roedores silvestres na Amazônia brasileira.....	24
Figura 5 -	Distribuição dos locais de procedência dos pacientes com leishmaniose tegumentar americana, residentes em Manaus, realizado com georeferenciamento.....	44
Figura 6 -	– Distribuição de pacientes com leishmaniose tegumentar americana, procedentes de Manaus, Região Metropolitana de Manaus, Rondônia, Roraima, Guiana e Pará.....	44
Figura 7 -	Distribuição dos isolados identificados por espécie de <i>Leishmania</i> spp. pr utilizando teste de Reação de Imunofluorescência Indireta com anticorpos monoclonais, 2006 a 2008.....	45
Figura 8 -	Distribuição de desempenho das enzimas que identificaram espécies de <i>Leishmania</i> spp por testes de Multi locus Enzyme Electrophoresis, 2006 a 2008.....	45
Figura 9 -	Distribuição por espécie de <i>Leishmania</i> spp. identificadas por testes de Multi locus Enzyme Electrophoresis 2006 a 2008.....	47
Figura 10 -	Distribuição de espécies de <i>Leishmania</i> spp identificadas por testes de Reação de Imunofluorescência Indireta utilizando anticorpos monoclonais, e teste de, Multi locus Enzyme Electrophoresis 2006 a 2008.....	48
Figura 11 -	Distribuição de espécie de <i>Leishmania</i> spp. por testes de utilizando Reação de Imunofluorescência Indireta com anticorpos monoclonais, e teste de Multi locus Enzyme Electrophoresis nos isolados com infecção mista, 2006 a 2008.....	49
Figura 12 -	Representação diagramática dos padrões de Multi locus Enzyme electrophoresis em gel de agarose a 1%, enzima 6GPD.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6PDGH	Phosphate Glucose Hydrogenase (E.C.1.1.1.44)
AcMo	Anticorpos Monoclonais
ACON	Aconitase (E.C.4.2.1.3)
ADH	Álcool Deshidrogenase (E.C.1.1.1.1)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosine TriPhosphate
dNTP	Desoxirribonucléico Trifosfato
EDTA	Ácido Etileno Diamino Triphosphate
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
NaHPO ₄	Fosfato de Sódio(anidro)
G6PDH	Glucose 6 Phosphato Hydrogenase
GGPL	Glico Lipo Phospho Glicane
Gp63	Glicoproteína 63
GPI	Glicosyl phosphatidil inositol
GPI	Glucose Phosphato Isomerase (E.C.5.3.1.9)
GPL	Glycosil Inositol Phospholipide
HCL	Ácido Clorídrico
HE	Hexoquinase (E.C.2.7.1.1)
ICD	Isomerase Citric Dehidoxidase (E.C.1.1.1.42)
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IL	Interleucina
INF γ	Interferon γ
kDNA	Kinetoplasto Ácido Desoxiribonucleico
L(L)	<i>Leishmania (Leishmania)</i>
L(V)	<i>Leishmania (Viannia)</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LCDA	Leishmaniose Cutânea Difusa Anérgica
LCM	Leishmaniose Cutâneo-Mucosa
LDH	Lactato Dehydrogenase (E.C.1.1.1.27)
LM	Leishmaniose Mucosa

LPG	Lipofosofoglicano
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
mL	Mililitro
MLEE	Multi Locus Enzyme Electrophoresis
MPI	Manose phosphate Isomerase (E.C.5.3.1.8)
NAD	Nicotinamida Dinucleotídeo
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido
mg	Micrograma
nm	Nanômetros
NNN	Nicole Navy McNeal
PBSS	Phosphate Buffer Saline Solution
PCR	Polimerase Chain Reaction
PGM	Phospho glucomutase (E.C.2.7.5.1)
Ph	Phlebotomíneo
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RPM	Rotações por minutos
SBF	Soro Bovino Fetal
SINAN	Sistema Nacional de Agravos
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNF β	Fator de Necrose Tumoral beta
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Leishmanioses: aspectos gerais	15
1.2 Etiologia e Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar	16
1.3 Padrões de transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana	17
1.4 Diagnóstico laboratorial da Leishmaniose Tegumentar Americana	25
1.5 Métodos de identificação de <i>Leishmania</i> spp	27
2 JUSTIFICATIVA	31
3 HIPÓTESE	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 Geral	33
4.2 Específicos	33
5 MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1 Desenho do estudo	34
5.2 Local de estudo	34
5.3 Amostra	34
5.4 Coleta do material	35
5.5 Exame parasitológico	35
5.5.1 Exame direto.....	35
5.5.2 Punção aspirativa.....	35
5.5.3 Biópsia.....	36
5.6 Isolamento do parasito	37
5.7 Preparações de parasitos para caracterização	37
5.8 Ensaios Imunológicos e bioquímicos	37
5.8.1 Anticorpos monoclonais por imunofluorescência indireta(RIFI).....	37
5.8.2 Muti locus enzyme eletroforese (MLEE).....	38
5.8.2.1 Eletroforese de isoenzimas.....	38
5.8.2.2 Preparação da amostra, execução da técnica.....	39
5.9 Controles	39
5.10 Análise dos dados	40
5.11 Aspectos éticos	40
6 RESULTADOS	41

7 DISCUSSÃO.....	50
8 CONCLUSÕES.....	58
REFERENCIAS.....	59
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	82
APÊNDICE B Distribuição do perfil de isolados de <i>Leishmania</i> spp do estudo e de cepas de referencia da OMS nas infecções mistas.....	84
APÊNDICE C - Lista de identificação das espécies de referencia, dos isolados com os Eletromorfos obtidos por MLEE e os serodemas por Imunofluorescência Indireta.....	87
APÊNDICE D – Artigo submetido.....	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses: aspectos gerais

As leishmanioses são doenças parasitárias distribuídas no Velho Mundo (Sul da Europa, Leste Central e Oeste da África e Ásia Central) e no Novo Mundo, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (TAVARES-NETO et al., 2003). No continente americano, as formas clínicas da doença são conhecidas como leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA). Consideradas como uma das seis mais importantes doenças endêmicas constitui um problema de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais, no mundo. A leishmaniose tegumentar, apresenta uma incidência de 1 a 1,5 milhões de casos/ano, cerca de 90% dos casos ocorrem na Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. São também registrados cerca de 500 mil casos/ano de leishmaniose visceral (LV) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1990)

As manifestações clínicas da LTA podem variar desde infecções assintomáticas, a apresentação de lesões cutâneas simples, úlceras muco-cutâneas mutilantes até a forma difusa, considerada a apresentação mais anérgica da doença e de difícil tratamento (FRANKE et al., 1990; LHANOS-CUENTAS et al., 1984).

Os casos de LVA podem ser de forma assintomática, oligossintomática ou de forma clássica com importante hepatoesplenomegalia, freqüentemente, levando o indivíduo à morte quando não tratado (BADARÓ et al., 1986; De BEER et al., 1990). Esse amplo espectro de manifestações clínicas é conseqüência da complexa interação do parasito/hospedeiro (GRIMALDI; TESH, 1993).

Nas últimas décadas, tem havido um aumento no número de casos de todas as formas da doença associado à expansão geográfica dos mesmos. São relatados também, associação da infecção pelo HIV com *Leishmania* spp. caracterizando a co-infecção *Leishmania*/HIV, com projeções de seu crescimento contínuo devido à superposição geográfica das duas infecções, como conseqüência da urbanização das leishmanioses e da interiorização da infecção pelo HIV (BRASIL, 2002).

Relatos da co-infecção *Leishmania*/HIV foram descritos na Europa a partir da década de 80, desde então, esta co-infecção é considerada emergente em 34

países, devido às altas prevalências de HIV em áreas endêmicas de leishmaniose (DESJEUX, 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). Têm sido relatados diversos casos de co-infecção *Leishmania* / HIV na forma tegumentar (BORGES, et al.,1999; ORSINI, 2002; POSTIGO, 1997; SAMPAIO,et al., 2002), inclusive relatos de leishmaniose visceral que no curso do tratamento o paciente evoluiu com lesões disseminadas e apresenta formas amastigotas do parasito no exame histopatológico da biopsia de pele (BITTENCOURT, 2003).

A LTA também é autóctone das Américas que apresenta variável grau de comprometimento da saúde humana. Manifesta-se por diferentes formas clínicas, incluindo a(s) forma(s) de lesão (ões) cutânea(s) única ou múltipla (forma disseminada), em alguns casos também são encontrados enfartamentos ganglionares denominados de linfangites bem como micro lesões satélites denominadas de leishmânides.

A apresentação na forma mucosa (espúndia), com o comprometimento do trato respiratório superior, particularmente o septo nasal. Caracterizando-se pelo aparecimento de edema, hiperemia, ulceração e necrose, com risco de ocorrência de deformidades, Estima-se que 2 a 10% dos pacientes infectados por *L(V) braziliensis* desenvolverão LMS, Porém Guerra, 2009(informação verbal) encontrou *L(V.) guyanensis* parasitando pacientes com leishmaniose mucosa no Amazonas. E a forma cutâneo-difusa é a mais grave e não responde a tratamentos. (MARSDEN, 1986;1994; REY, 2001).

1.2 Etiologia e Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar

Os parasitos são transmitidos aos hospedeiros mamíferos, inclusive o homem, pela picada de insetos, que se alimentaram previamente em um reservatório infectado (RYAN et al., 1987). Os insetos são fêmeas hematófagas de diversas espécies conhecidas genericamente como flebotomíneos, da Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, subgêneros Nyssomyia e Psychodopygus pertencentes a várias espécies e diferentes gêneros (*Psychodopygus*, *Lutzomyia*), dependendo da localização geográfica. Nas Américas,

existem aproximadamente 30 espécies de *Lutzomyia* com comprovada capacidade de transmitir *Leishmania* spp. (LAINSON; SHAW; 1998).

São insetos pequenos com tamanhos que variam de 1,5 a 3 mm, olhos grandes, muito pilosos e de cor palha e castanho-claros, facilmente reconhecíveis pela atitude que adotam quando pousados, pois as asas permanecem entreabertas e ligeiramente levantadas, em vez de se cruzarem sobre o dorso (REY, 1992).

Por isso, este mosquito também é conhecido como cangalha, cangalhinha, asa dura, orelha-de-veado, palha, birigui, tatuíra, bererê, tatuquira, murutinga, escangalhado e asa branca. Estes insetos costumam abrigar-se em troncos de árvores, tocas de animais, folhas caídas no solo, copa das árvores e frestas em rochas (Figuras 2) (ALEXANDER et al., 1992; AZEVEDO et al., 1993, 1990; BRASIL 1997; 2007, MARZOCHI et al., 1999; REY 1992).

Os agentes etiológicos da doença são protozoários da ordem Kinetoplastida, da família Tripanosomatidae e gênero *Leishmania*. Apresenta-se sob duas formas: uma flagelada (promastigota) e outra aflagelada (amastigota). Na tentativa de classificar morfologicamente as leishmânias são utilizados vários parâmetros para diferenciar as espécies, como por exemplo, o diâmetro do cinetoplasto (organela auto replicável que contém DNA extracelular) e espaçamento de micro túbulos sub-peculiares (GARDENER et al., 1974; SHAW; LAINSON; 1987). Lainson et al.,(1979) propuseram uma nova classificação para o gênero *Leishmania* com base no desenvolvimento dos flagelados no tubo digestivo dos vetores.

Posteriormente a classificação das *Leishmanias* ganhou novo impulso, com base em critérios mais consolidados, como o estudo morfométrico das formas amastigota e promastigota em microscopia eletrônica, a mobilidade eletroforéticas de isoenzimas (MILES et al., 1981), a determinação da densidade flutuante do DNA do núcleo e do cinetoplasto (GRIMALDI; TESH,1993; WORTH; McMAHON-PRATT,1983; ROGERS et al., 1987, 1988, 1990), a análise de produtos de degradação do DNA por enzimas de restrição (JACKSON et al.,1984), e a radio espirometria (DECKER-JAKSON; TANG 1980).

Atualmente os padrões fenéticos de *Leishmania* spp. estão agrupados em 68 zimodemas, que por análise de métodos fenéticos e filogenéticos formam cinco complexos fenéticos: *L. braziliensis*, *L. naiffi*, *L. guyanensis* / *L. panamensis*/*L. shawii*, *L. mexicana*. As *L.(V) braziliensis* e *L.(V) naiffi* são grupos altamente heterogêneos, apresentando 15 e 11 zimodemas respectivamente. As espécies

L.(L.) chagasi, *L.(L.) amazonensis* estão inclusas no perfil fenético de *L. major*. As espécies *L.(V.) lainsoni*, *L.(V.) equatorensis* e *L. colombiensis* apresentam zimodemas distintos das outras espécies (EL TAI et al., 2001).

A incidência da LTA no Brasil vem aumentando consideravelmente, cerca de 21.000 casos foram notificados em 1998, com o aumento da ocorrência para 40.000 em 2002. Em média, apresenta uma incidência de 35.000 casos/ano e encontra-se distribuída desde o sul da Bacia Amazônica ao sul do país. Tendo os seguintes coeficientes de detecção até o momento dos anos de 2000 (308,2), 2001 (310,9), 2002 (338,2) e 2005 (313,6) (DESJEUX, 2004; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; REBELLO et al., 2010).

Em 2003, foi confirmada a autoctonia da doença em todas as unidades federativas do país (BRASIL, 2007), foram registros 3.174 casos no Município de Manaus, correspondendo 60,18% do total do estado do Amazonas. Já em 2006 foram notificados na Região Norte cerca de 172.349 casos e no estado do Amazonas 31.549 (GUERRA et al., 2006). Manaus concentra o maior número de casos da doença com ocorrência em média de 600 casos/ano (BRASIL, 2007).

1.3 Padrões de Transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana

A LTA é considerada originalmente uma zoonose, nas últimas décadas observa-se mudanças no perfil epidemiológico e atualmente ela pode ser detectada tanto no ambiente silvestre quanto peri-urbano (SHAW; LAINSON, 1987). As zoonoses podem ser classificadas de acordo com o ecossistema no qual elas circulam: (i) zoonose sinantrópica - o ciclo ocorre no ambiente peri-urbano ou doméstico e as fontes de infecção são animais domésticos ou sinantrópicos; (ii) zoonose exoantrópica - a transmissão se processa nos "habitats" silvestres, em focos naturais, fora do ambiente humano (ROTUREAU, 2006).

No Brasil, a LTA apresenta três padrões epidemiológicos característicos:

- a) Silvestre – A transmissão ocorre em área de vegetação primária e é fundamentalmente uma zoonose de animais silvestres, que pode acometer o ser humano quando este entra em contato com o ambiente silvestre, onde esteja ocorrendo enzootia;

- b) Ocupacional e Lazer – Este padrão de transmissão está associado à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, usinas hidrelétricas, instalação de povoados, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, treinamentos militares e ecoturismo;
- c) Rural e peri - urbano em áreas de colonização – Este padrão está relacionado ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos, associados a matas secundárias ou residuais (MARZOCHI, 1992).



Figura 1 – ‘ (Foto ampliada).
Fonte: Brasil (1994, 2007)

Os flebotomíneos apresentam hábitos noturnos e são encontrados em tocas de animais, currais, chiqueiros, podendo invadir residências e abrigam-se em locais mais escuros. Somente as fêmeas são hematófagas, mas tanto elas quanto os machos, podem alimentar-se de seiva e sucos vegetais, o que é fundamental no desenvolvimento da leishmânia. Sua vida média é de 30 dias. Seus vôos são curtos e baixos, caracterizando-se por um aspecto saltitante em um raio de ação não superior a 200 metros (IGLESIAS, 1997; MARZOCHI et al., 1999; REY, 1992).

Com a destruição das matas nativas, os *habitats* naturais destes insetos foram alterados. Desse modo, as espécies que de alguma forma resistem às condições adversas conseguem explorar novos ambientes, aproximando-se cada vez mais do peridomicílio (LAINSON; SHAW, 1998).

Em geral, os flebotomíneos se alimentam de sangue em diferentes hospedeiros, mas a diminuição na biodiversidade de mamíferos, como resultado das alterações ambientais e a urbanização, pode levar a uma concentração da transmissão de Leishmânia pela pressão exercida nos vetores de se alimentarem no

homem e em reservatórios sinantrópicos (CAMPBELL-LENDRUM et al., 1999, 2000, 2001).

No Brasil, as principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutetta*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermédia*, *L. wellcomei*, *L. migonei*, *L. neivai* e *L. fischeri*. Estas espécies de flebotomíneos foram definidas como vetores por atenderem aos critérios que atribuem a uma espécie a competência vetorial. Cabe ressaltar que o papel vetorial de cada uma dessas espécies dependerá da espécie de *Leishmania* presente no intestino (RANGEL; LAINSON, 2009).

Embora ainda não tenha sido comprovado o papel da *L. neivai* como vetor da LTA, esta espécie tem sido encontrada com frequência em ambientes domiciliares em áreas de transmissão da doença (DIAS-SVERSUTTI et al., 2007). Assim como *L. fischeri* que ainda não foi encontrada infectada por parasitos da leishmaniose, porém, sua forte relação com hábitat humano e a alta antropofilia permite incriminar esta espécie como vetor secundário da LTA (CAMARGO-NEVES, 1999).

No Brasil as espécies de flebotomíneos que estão envolvidas no ciclo de transmissão da LTA encontram-se distribuídas principalmente nas regiões correspondentes à primitiva cobertura da Mata Atlântica, do Nordeste ao Sudeste do país (MARZOCHI, 1992; SHAW; LAINSON, 1987; SHAW et al., 2007). Em São Paulo, no Rio de Janeiro, Espírito Santo e em Minas Gerais, o vetor incriminado é *L. intermédia*, embora *L. whitmani* apresente densidade importante. Verifica-se nesta região similaridade quanto ao padrão de transmissão envolvido e sobre o papel do cão como possível reservatório secundário na manutenção de um ciclo doméstico (FALQUETO et al., 1986, 1991, 1994, 1996; GOMES et al., 1989, 1995; MAYRINK et al., 1979, 1988, 1995).

Na região Nordeste, essa endemia apresenta características eco-epidemiológicas diversas, embora com alguma similaridade intra-regional. Na Bahia, os estudos realizados na localidade Três Braços, região cacauieira com resquícios de Mata Atlântica primitiva, *L. whitmani* é o vetor incriminado (VEXENAT et al., 1986), mas não foram identificados reservatórios e o padrão de transmissão envolvido (FRANÇA et al, 1991; JONES et al., 1987; MARSDEN, 1994).

No Ceará, os estudos realizados na região de Baturité apresentam resultados heterogêneos. O vetor possivelmente envolvido na transmissão florestal é *L. wellcomei* (READY et al., 1983), enquanto *L. whitmani* e *L. migonei* estariam

associados à transmissão peridomiciliar (AZEVEDO et al., 1990; 1993; DE QUEIROZ et al., 1994).

Na Amazônia é encontrada uma ampla cadeia de focos geograficamente diferentes e uma diversidade de reservatórios mamíferos e espécies de vetores. Dentre as espécies registradas como reservatórios de *Leishmania* estão alguns marsupiais, roedores, desdentados, procionídeos, canídeos e primatas. Raras infecções foram observadas em morcegos, e nenhum registro em pássaros, répteis e anfíbios até o presente. É possível observar que em muitas localidades, mais de uma espécie pode parasitar um mesmo hospedeiro animal e vetores, assim como pode compartilhar este hospedeiro com outros patógenos (LAINSON, 1985; LAINSON et al., 1992).

As principais espécies de vetores considerados como transmissores da doença no Amazonas são: *Lutzomyia umbratilis*, *L. anduzei*, as mais importantes e *L. flaviscutellata* para *L.(L.) amazonensis*, e ainda *L. welcomei*. Em Manaus as espécies envolvidas são *L. umbratilis* envolvidos na transmissão da *L.(V.) guyanensis* e *L. anduzei* (BRASIL, 2007; GUERRA et al., 2006).

A transmissão de *Leishmania* pode ocorrer por diferentes espécies de flebotomíneos daquelas associadas aos ciclos enzoóticos silvestres. O vetor uma vez, infectado com protozoários de espécies diferentes, pode assumir o papel principal de vetor transmissor da doença em áreas endêmicas que apresentam a LTA (VOLF et al., 2007). Como exemplo a *L. longipalpis*, é um potencial vetor de outras espécies de Leishmânia, tais como *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (SHAW, 2007). O mesmo acontece com *L. flaviscutellata* com relação à *L.(L.) amazonensis* encontrado infectado com *L. (V.) guyanensis* (FOUQUE et al., 2007).

Os ciclos de transmissão da LTA variam de acordo com a região geográfica, envolvendo uma diversidade de espécies de parasito, vetores, reservatórios e hospedeiros. Dos diferentes subgêneros e espécies de *Leishmania* que causam LTA no Brasil as mais importantes são:

Leishmania (Leishmania) amazonensis: ocorrem em áreas de florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão), e nos estados das regiões Nordeste (Bahia, Ceará e Piauí), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Sul (Paraná). Evidências indicam que os reservatórios desta espécie de *Leishmania* são pequenos roedores silvestres, na Amazônia são citados: *Proechymis*, *Oryzomys*. Os flebotomíneos

vetores são: *L. flaviscutelatta*, *L. reducta* e *L. olmeca nociva* (Amazonas e Rondônia) (Figura 2). A *L. (L.) amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, alguns indivíduos podem desenvolver o quadro clássico da leishmaniose cutânea difusa (LCD) (LAINSON; SHAW, 1972).

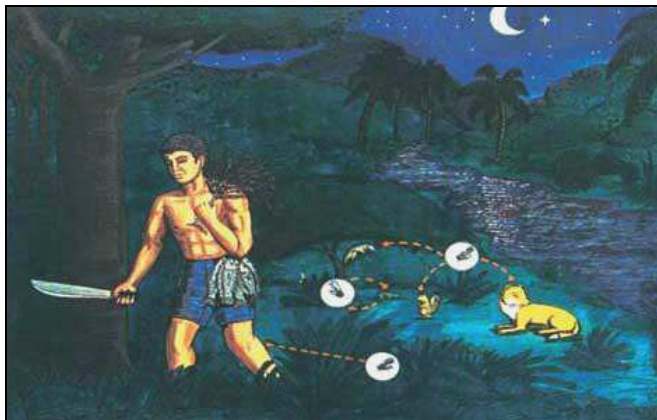


Figura 2- Ciclo de transmissão da *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na Amazônia brasileira
 FONTE: Brasil (2007).

Leishmania (Viannia) guyanensis: encontra-se na região Norte na Bacia Amazônica (Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará), estendendo-se para Guianas. E encontrado principalmente em florestas de terra firme. Os animais tais como a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) e o gambá (*Didelphis albiventris*), atuam como reservatórios e os vetores envolvidos na transmissão são os seguintes: *L. umbratilis* (principal vetor) e *L. anduzei* (Figura 3).

A *L. (V.) guyanensis* causa predominantemente lesões ulceradas cutâneas únicas ou múltiplas, sendo que as lesões múltiplas são conseqüências de picadas simultâneas de vários flebotomos infectados ou metástases linfáticas secundárias. E muito raro o comprometimento mucoso por esta espécie (SHAW; LAINSON, 1987).

A doença atinge principalmente indivíduos do sexo masculino, jovens e adultos, em fase produtiva, o que caracteriza a ocorrência ocupacional nas frentes de trabalho, associada ao desflorestamento, penetração em áreas de florestas virgens, e exercícios militares. Em áreas endêmicas pode haver percentuais expressivos de crianças acometidas pela doença (MARZOCHI, 1992).

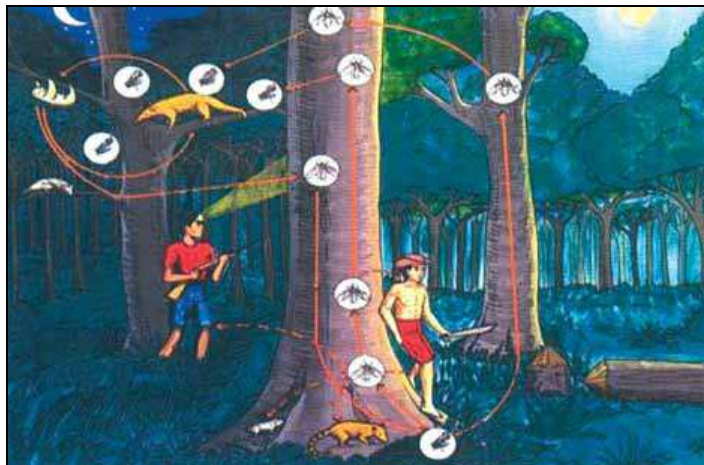


Figura 3 - Ciclo de transmissão da *L.(V.) guyanensis* na Amazônia
 FONTE: Brasil (2007)

Leishmania (Viannia) braziliensis: foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita como agente etiológico da LTA. É a mais importante, não só no Brasil, mas em toda a América Latina, com ampla distribuição, desde a América Central até o norte da Argentina. Estudos mostram que os prováveis reservatórios do parasito são roedores silvestres (*Bolomys (= Necromys) lasiurus*, *Nectomys squamipes*) e sinantrópicos (*Rattus rattus*), identificados com infecção natural em Pernambuco (BRANDÃO FILHO, 2003), felídeos (*Felis catus*) no Rio de Janeiro, canídeos (*Canis familiaris*) no Ceará, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo e eqüídeos (*Equus caballus*, *Equus asinus*) nos estados do Ceará, Bahia e Rio de Janeiro (MARZOCHI, 1992).

Embora o papel desempenhado por roedores silvestres e sinantrópicos no ciclo de transmissão ainda não tenha sido bem definido, as evidências indicam os como prováveis reservatórios primários. A eco-epidemiologia da LTA associada à *L. (V.) braziliensis* vem assumindo características distintas no decorrer do tempo nos diferentes biomas do país. A transmissão em áreas de floresta está relacionada a vetores como *L. complexa* e *L. wellcomei*, encontrado em áreas de transmissão no ambiente florestal dos Estados do Ceará (AZEVEDO et al., 1990), e Pernambuco (ANDRADE et al., 2005). *L. whitmani* é o principal vetor no Brasil, encontrado abundantemente em áreas endêmicas dos estados de Pernambuco, Bahia, Ceará, Mato Grosso do Sul e Paraná. *L. migonei* também é outra espécie envolvida nos estados do Ceará e Rio de Janeiro, enquanto que *L. neivai* no sul do Brasil e *L.*

intermedia no Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (RANGEL; LAINSON, 1988; LAINSON; SHAW, 1998) (Figura 4).

A doença no homem é caracterizada por úlcera cutânea, única e/ou múltipla, cuja principal complicação é a metástase por via hematogênica, para as mucosas da nasofaringe, com destruição desses tecidos, com freqüência de 85% dos casos nas áreas endêmicas. Provavelmente, esta relacionada ao diagnóstico e tratamento precoces (MARZOCHI, 1992).



Figura 4 - Ciclo de transmissão da *L.(V.) braziliensis* entre *L.wellcomei* e roedores silvestres na Amazônia brasileira.
FONTE: Brasil (2007).

Leishmania (Viannia) shawi: encontra-se distribuída nas regiões Nordeste e sudeste do Estado do Pará e região oeste do Maranhão e em algumas regiões do Amazonas. Os reservatórios encontrados são: macacos (*Chiropotes satanas* e *Cebus apella*), quati (*Nasua nasua*) e preguiça (*Choloepus didactylus*). A transmissão é feita pelo vetor *L. whitmani*, Lainson et al. (1988). A forma clínica da doença é caracterizada por lesões cutâneas únicas (LAINSON et al., 1989; LAINSON; SHAW, 1998).

Leishmania (Viannia) lainsoni: distribuída nos estados de Rondônia, Acre e Pará, é transmitida pelo *L. ubiquitousis*, flebotomíneos de baixa antropofilia, tendo como possível reservatório o roedor silvestre *Agouti paca* (*paca*). Têm sido registrados casos raros da doença humana, normalmente caracterizado por lesões cutâneas únicas, ulceradas que geralmente evoluem para cura (SILVEIRA et al., 1991).

Leishmania (Viannia) naiffi ocorre nos estados do Pará e Amazonas. Três espécies de flebotomíneos são responsáveis pela transmissão vetorial: *L. ayrozai*, *L. paraensis* e *L. squamiventris*. O tatu (*Dasypus novemcinctus*) é o reservatório, com relato de poucos casos humanos. Têm sido registrados casos raros da doença humana, normalmente caracterizado por lesões cutâneas únicas, ulceradas que geralmente evoluem para cura (LAINSON; SHAW; 1989).

Leishmania (Viannia) lindembergi foi descrita de infecções em soldados em treinamento em uma área de reserva florestal no Estado do Pará. Não existe relatos de infecções em animais ou flebotomíneos. A espécie provável como vetor é *L. antunesi*, (SILVEIRA et al., 2002, 2004). Segundo informação verbal de Dr. Jorge Guerra a presença muito freqüente de *L. antunesi* em Cacoal-RO.

1.4 Diagnóstico Laboratorial de Leishmaniose Tegumentar

O desenvolvimento de métodos sensíveis e específicos para o diagnóstico da LTA vem sendo cada vez mais utilizados. Os recentes avanços em biologia molecular vêm possibilitando um diagnóstico cada vez mais acurado no que diz respeito à identificação da espécie da *Leishmania*, contudo os critérios clínico-epidemiológicos permanecem fundamentais na definição do diagnóstico (CARDOSO et al., 1998). O diagnóstico laboratorial da leishmaniose se constitui fundamentalmente de três grupos de exames (BRASIL, 1994, 1996, 1997, 1998, 2000, 2002, 2007):

Exames parasitológicos

A demonstração do parasito pode ser feita através de diferentes técnicas parasitológicas:

a) O exame direto é o teste de primeira escolha e consiste na pesquisa direta em microscopia óptica das formas amastigotas em material obtido da borda da lesão por escarificação, aspiração ou biópsia, em lâminas coradas por Giemsa, Leishman ou Panótico. É o procedimento mais rápido, de menor custo e de fácil execução. A probabilidade de encontro do parasito é inversamente proporcional ao tempo de

evolução da lesão cutânea, (MARZOCHI, 1992). São utilizados os seguintes procedimentos: escarificação, biopsia (por análise histopatológica permite diagnóstico compatível com e é também utilizada no diagnóstico diferencial de processos ulcerativos indefinidos, uma vez que o diagnóstico de certeza pela histopatologia somente é dado quando se identifica o parasito nos tecidos com impressão por aposição e punção aspirativa (BRASIL, 1994, 1996, 1997, 1998, 2000, 2002, 2007);

b) Isolamento em cultivo *in vitro* (meios de cultivo) É um método de confirmação do agente etiológico que permite a posterior identificação de espécies de *Leishmania* spp envolvidas. Opcionalmente, pode-se utilizar material obtido diretamente das úlceras por punção com o *vacuotainer* (tubo selado a vácuo) contendo meio de cultura, (BRASIL, 2007). Contudo, é difícil manter o parasito *in vitro* devido as contaminações (RODRIGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2006);

c) Isolamento *in vivo* (inoculações animais).

Exames imunológicos:

a) Teste de intradermorreação de Montenegro, (IDRM) ou da leishmanina. Fundamenta-se na visualização da resposta de hipersensibilidade celular retardada. É resposta celular durante a doença e após a cura clínica da infecção. Seu emprego tem grande valor presuntivo no diagnóstico de LTA, por sua sensibilidade e especificidade, especialmente nos casos em que os parasitos são escassos ou ausentes, sendo também bastante útil nos inquéritos epidemiológicos em áreas endêmicas inclusive nos diagnósticos de leishmaniose mucosa dessas áreas (BRASIL, 2007; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000; MARZOCHI, 1992);

b) Testes sorológicos: Esses testes detectam anticorpos anti-*Leishmania* circulantes no soro dos pacientes. As técnicas utilizadas são: ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), RIFI (reação de Imunofluorescência Indireta) nesta podendo utilizar anticorpos monoclonais, (McMAHON-PRATT; DAVID, 1981; McMAHON-PRATT et al., 1982; 1984) e Western Blot, utilizados para a detecção de anticorpos circulantes. Embora demonstrem 70 a 91% de sensibilidade, não distinguem infecção presente da passada e reagem cruzadamente. A PCR reproduz *in vitro* a habilidade natural de replicação do DNA, podendo ser repetida em larga

escala. A metodologia requer, primeiramente, o conhecimento, pelo menos parcial, do DNA alvo de um determinado organismo, para o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) ou sondas que irão hibridizar-se especificamente à seqüência alvo. A técnica de hibridização por PCR aumenta a sensibilidade na detecção e identificação do parasito no diagnóstico da leishmaniose (DUMON, 1995). Com *T. cruzi* e leishmaniose visceral (BRITO et al., 2000, 2009).

Exames moleculares: reação em cadeia de polimerase (PCR)

É um método de análise do DNA do parasito por meio da técnica de amplificação pela Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) que vem sendo amplamente utilizado para fins de pesquisa. Na rotina de diagnóstico, é pouco utilizado, porém acrescenta em sensibilidade quando utilizado com os métodos parasitológicos tradicionais. Por apresentar alta sensibilidade e especificidade. Atualmente estão disponíveis diferentes modalidades da técnica: a) PCR por hibridização (mini círculos); b) PCR-RLP; c) PCR (G6PhD) e d) PCR Real Time, (BRASIL, 2000, 2002, 2007; GRIMALDI, 1995, GRIMALDI; TESH, 1993; GRIMALDI et al., 1987; 1991; LOPEZ et al., 1993).

Recentemente a ferramenta molecular que mais contribui para o diagnóstico e genotipagem do parasito, é a PCR. Esta técnica pode diferenciar entre os subgêneros *Viannia* e *Leishmania* com à alta sensibilidade e especificidade, além de corroborar com a caracterização por eletroforese de isoenzimas e imunofluorescência indireta utilizando anticorpos monoclonais (BRANDÃO FILHO; SHAW, 2006; BRITO et al., 1993).

A utilização da PCR tem demonstrado maior acurácia em relação aos métodos de diagnósticos convencionais (ISAZA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2002; WEIGLE et al., 2002). A PCR permite a utilização em diferentes amostras como bloco parafinado, biópsia de pele e/ou mucosa, aspirados de lesões e medula e também em esfregaço (escarificados, "imprints") corados pelo Giemsa (LASKAY et al., 1995; MOTAZEDIAN et al., 2002), podendo ser utilizado uma pequena quantidade de amostra do material a ser estudado (MEREDITH et al., 1993).

1.5 Métodos de identificação de *Leishmania* spp

Os métodos de identificação de espécies de *Leishmania* spp. utiliza antígenos específicos de membrana externa que reagem com anticorpos monoclonais, (McMAHON-PRATT et al., 1982) e as técnicas de hibridização do DNA/RNA, (BARKER; BUTCHER, 1983; LOPEZ et al., 1988).

Os anticorpos monoclonais são moléculas idênticas em estrutura, que possuem sítios de ligação e idiótipos altamente específicos para um determinado antígeno (JANEWAY, 2002). Podem prover de maneira inequívoca a identificação de espécies de *Leishmania* spp. e são especialmente eficazes na identificação de cepas que pertencem à mesma espécie (ROMERO et al., 2002, 2005).

Os anticorpos monoclonais são produzidos a partir de sorotipos que se baseiam na interação de soro de coelhos imunizados com as cadeias de carboidratos que possuem os determinantes antigênicos liberados pelas atividades durante o crescimento dos parasitos, também conhecidos como fatores de excreção (FE) e que bioquimicamente comportam-se como carboidratos polianiônicos ligando-se aos anticorpos de coelhos (JACOBSON et al., 1984).

Ainda não foi esclarecido como às moléculas de açúcares de cada espécie estão configuradas espacialmente na cadeia dos carboidratos conferindo ou dando especificidade aos sorotipos. Jacobson et al., (1984), relataram sobre um grupo de lecitinas (carboidratos aniônicos) nos sorotipos que medeiam às aglutinações entre os parasitos, mostrando também como os fatores de excreção (FE) reagem com as porções antigênicas de *Leishmania* spp., que são glicoproteínas de superfície. Esses sistemas clássicos permitem a identificação de parasitos em grandes grupos, geralmente designados Na.Ba e AnB2. (GREENBLATT et al., 1983).

Com a produção de anticorpos monoclonais, foi possível distinguir as espécies de *Leishmania* do Novo Mundo das do Velho Mundo (McMAHON-PRATT; DAVID, 1981; McMAHON-PRATT et al., 1982; 1984) e em grande parte, a identificação a nível de espécie (HANHAM et al., 1990). Embora esses anticorpos tenham sido utilizados amplamente nos estudos epidemiológicos e taxonômicos (McMAHON-PRATT et al., 1982), sua reatividade aos antígenos espécie-específico do parasita pode apresentar variações dentro de uma mesma espécie, dependendo de suas origens geográficas (SHAW et al., 1986).

Outro método que é utilizado para a caracterização das espécies de *Leishmania*, é a análise eletroforética de isoenzimas, também chamada de Multi Locus Enzyme Electrophoresis (MLEE)- Eleletroforese de Isoenzimas, que permite detectar um grande número de genes estruturais, provendo evidências genéticas para distinguir polimorfismos entre espécies, bem como informar as diferenças na reprodução da isoenzima originadas no parasito (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1990). Pode também estar associada à avaliação dos produtos dos genes e não das seqüências genéticas, o que permite que mutações silenciosas passem despercebidas e, assim, cepas distintas possam ser consideradas idênticas (ZAIDI et al.,2003; ZEMANOVÁ et al., 2004).

Uma das limitações deste método é a necessidade da preparação de uma de grande massa de cada espécie de parasito a ser avaliada e cepas de referência, para que a comparação possa ser realizada, aumentando desta forma a chance de interferências e contaminações durante a manipulação das amostras (EL TAI et al., 2001; MORALES et al., 2001; ZAIDI et al.,2003).

Métodos de identificação de espécies de *Leishmania* spp. podem contribuir para estabelecer a(s) espécie (s) de Leishmânia circulante em uma região, contribuindo para o diagnóstico etiológico e melhor acompanhamento clínico e prognóstico da doença. Na região Amazônica, causas de LTA são sete até o momento as espécies de *Leishmania* spp descritas como patogênicas ao homem. E a doença apresenta-se de diversas manifestações clínicas, sendo a mais grave a forma difusa (KILLICK-KENDRICK, 1999).

O primeiro caso humano, na Amazônia, de infecção por leishmaniose tegumentar na forma mista foi determinada por *Leishmania braziliensis* e a *Leishmania amazonensis*. As duas amostras foram isoladas de lesões de paciente, e a caracterização das espécies foi realizada com base em observação de infecção experimental em *L. longipalpis*, e eletroforese de isoenzimas em gel de amido. Esse registro feito no estado do Pará, que é área de importante circulação de espécies de *Leishmania* quanto o estado do Amazonas (SILVEIRA et al.,1984)

Esse achado revestiu-se de interesse do ponto de vista médico para o tratamento precoce da doença, uma vez que o paciente infectado pela *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* poderá evoluir para a forma anérgica ou difusa, forma mais grave da doença, que até o momento não tem cura.

Na região Amazônica, a LTA é zoonose com transmissão predominantemente

a partir de ciclos silvestres e peri domiciliares, como assentamentos populacionais na periferia da floresta. São conhecidas sete espécies de *Leishmania* spp descritas como patogênicas ao homem e diversos de vetores. A doença apresenta-se de diversas manifestações clínicas, sendo a mais grave a forma difusa (KILLICK-KENDRICK, 1999; SILVEIRA et al., 1991, 2002, 2004).

No município de Manaus, principalmente na periferia da cidade e da região metropolitana, o grau de exposição dos indivíduos acometidos está relacionado diretamente a processos de ocupação urbana desordenada. Dessa forma, em geral a LTA ocorre em lugares de assentamentos populacionais recentes e relacionados a desmatamentos, em populações próximas a áreas de floresta primária, onde a *L. (V.) guyanensis* é a principal espécie envolvida, no entanto, o envolvimento de outras espécies do parasito ainda precisa ser melhor estudadas (GUERRA, et al., 2006).

2 JUSTIFICATIVA

Para contribuir com a melhor caracterização da ecoepidemiologia da LTA, no estado do Amazonas, uma das formas é identificando a variedade de espécies de *Leishmania* que causam a doença e levam às suas diversas manifestações clínicas. Neste sentido, a identificação e caracterização das espécies podem contribuir para melhorar o entendimento da doença na região.

A implementação de técnicas laboratoriais que permitam identificar as espécies de *Leishmania* spp que circulam nesta área endêmica da região norte, podem também melhorar a complementação diagnóstica e prognóstica da LTA. No estado do Amazonas a LTA é endêmica e apresenta grande espectro de variabilidade, inferido pela diversidade de espécies encontradas. Nestas áreas circulam várias espécies de *Leishmania* spp. ainda sem classificação taxonômica consolidada, e com a possibilidade da ocorrência de “infecções mistas”.

Manaus passa por uma expansão populacional desordenada em direção à floresta o que vem aumentando o grau de exposição dos indivíduos acometidos. Dessa forma, em geral a LTA ocorre em lugares de assentamentos populacionais recentes e relacionados a desmatamentos, em populações próximas a áreas de floresta primária, onde a *L. (V.) guyanensis* é a principal espécie envolvida, mas com o envolvimento de outras espécies do parasito. Registra-se a presença com frequência de *L. antunesi* em Cacoal-RO (informação oral Dr. Jorge Guerra).

Clínica da doença: O diagnóstico clínico-parasitológico-epidemiológico permite o tratamento precoce em muitos casos, mas também a perspicácia da população em reconhecer as lesões causadas pelo parasito de *Leishmania* spp são um complemento diagnóstico, muito forte para o sucesso da cura clínica. Entretanto a identificação da espécie do parasito pode auxiliar em tomada de decisões entre o médico e o paciente na eficiência da escolha do tratamento ou do não tratamento influenciando também no prognóstico de seguimento após o tratamento.

Diante do exposto, a caracterização da ecoepidemiologia da LTA, identificando a variedade de espécies de *Leishmania* que causam a doença e levam às suas diversas manifestações clínicas é preciso e neste sentido, a identificação e caracterização das espécies podem contribuir para o entendimento da doença nesta região endêmica permitindo a ampliação da complementação diagnóstica.

3 HIPÓTESE

A caracterização das espécies de *Leishmania* spp. em isolados de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da região norte do Brasil contribuirá para esclarecer aspectos relacionados a diversidade de espécies dos parasitos e melhorar o diagnóstico complementar laboratorial, e conseqüentemente o seguimento após o tratamento dos indivíduos acometidos por LTA.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Caracterizar as espécies de *Leishmania* spp. em amostras isoladas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da região norte do Brasil.

4.2 Específicos

- a) Realizar o diagnóstico parasitológico em pacientes suspeitos de LTA;
- b) Isolar *Leishmania* spp. de amostras suspeitas de LTA em fragmentos de biópsias e/ou punção aspirativa de borda de lesões de pacientes;
- c) Identificar as espécies de *Leishmania* através de painel de anticorpos monoclonais específicos;
- d) Caracterizar as espécies de *Leishmania* utilizando um perfil eletroforético de isoenzimas;
- e) Verificar a correlação entre as espécies identificadas e os locais de infecção na procedência dos pacientes

5 MATERIAL E METODOS

5.1 Desenho do estudo

Tratou-se de um estudo experimental, descritivo, prospectivo com amostra de conveniência realizado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM) e no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ), no período de 2006 a 2008. Foram incluídos no estudo os pacientes que foram atendidos na FMTAM com hipótese diagnóstica de LTA. Realizou-se nesses pacientes, coleta de amostras para realização de exame parasitológico e concomitantemente foram realizados procedimentos laboratoriais na tentativa de isolamento, identificação e caracterização das espécies de *Leishmania* spp.

5.2 Locais de estudo

O estudo foi realizado no ambulatório de Infectologia, Dermatologia e no laboratório da Gerência de Leishmanioses na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM), centro de referência para doenças tropicais do estado do Amazonas.

5.3 Amostra

Todos os pacientes que possuísem hipótese diagnóstica de LTA que procuraram a FMTAM na demanda espontânea. Foram utilizados como critério de inclusão os pacientes com hipótese diagnóstica de LTA e que concordaram participar da pesquisa.

5.4 Coleta do material

Foram coletadas amostras através de escarificação de borda da lesão, punção aspirativa e/ou biopsia de uma lesão de cada paciente. A escarificação foi realizada para pesquisa direta, a punção aspirativa e/ou biopsia para cultivo e posterior obtenção de massa parasitária com o objetivo de identificar e caracterizar as espécies de *Leishmania* spp.

5.5 Exames parasitológicos

5.5.1 Exame direto

O exame direto foi realizado, por coleta na borda da lesão ulcerada, tratada antissépticamente, utilizando com lanceta e/ou de bisturi estéril. Com o material coletado eram feitos os esfregaços em lâminas, subseqüentemente fixados com metanol e corados pelo Giemsa e/ou Panótico. A visualização dos parasitos era realizada através de microscopia óptica em aumento de 100X.

5.5.2 Punção aspirativa

O aspirado era realizado após assepsia e ponto de anestesia (xilocaína 2%) através da introdução de agulha tipo “vacutainer” introduzida na borda da lesão para que o exudato fosse coletado para o interior de dois tubos de ensaio de 15 ml contendo 2 ml de meio Navy McNeal Nicole (NNN) (MARZOCHI et al., 1993, 1999). Esse material foi incubado a 25°C e observado a cada 3 dias, até o aparecimento das formas promastigotas do parasito e então era realizado o repique para outros dois tubos utilizando o líquido de condensação daqueles primeiros tubos.

5.5.3 Biópsia

A biópsia foi executada com “punch” de 2 a 4 mm de diâmetro, e retirado fragmento da borda da lesão ativa. No local da biópsia foi realizada a assepsia e anestesia com xilocaína a 2%. O fragmento foi colocado em solução salina com antibióticos durante 6 a 8 horas a temperatura ambiente. Após esse período o fragmento de biópsia foi macerado e inoculado em tubo com meio NNN, em fase líquida. Os tubos foram incubados a 25°C e observado a cada três dias até o aparecimento das formas promastigotas do parasito e então era realizado o repique para outros dois tubos utilizando o líquido de condensação daqueles primeiros tubos. As biópsias só eram realizadas quando eram solicitadas pelo médico.

5.6 Isolamento do parasito

Amostras isoladas de pacientes foram cultivadas em meio Novy, McNeal, Nicole (NNN), constituídas por duas fases, onde a fase sólida contém os componentes Brain Heart Infusion (BHI) e Ágar 5,2% dissolvidos em Água Bidestilada autoclavada. Essa mistura era dissolvida a 80°C sob agitação e distribuída em volume de 100 mL em frascos de Erlenmeyer e em seguida autoclavada. Logo após era adicionado 20mL de sangue de coelho desfibrinado e distribuído em tubos 15mL estéreis, sendo os mesmos inclinados aproximadamente 45º graus até a completa solidificação do meio, deixado em banho-Maria por 24 hs para criar líquido de condensação então estocados a 4°C (EVANS et al., 1993, 1989, 1984).

O meio Drosophia Schneider's formula completa, foi preparado de acordo com o fabricante (S9895-SIGMA) e esterilizado por filtração 0,02 µm por 2 vezes e eram adicionados 80mg/mL de gentamicina e acondicionado a 4°C, somente na hora do uso adicionava-se 20% de soro bovino fetal (SFB) desativado a 56°C.

5.7 Preparações de parasitos para caracterização

Os promastigotas em fase de crescimento exponencial eram sedimentados por centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C e lavadas duas vezes em salina tamponada com sais de fosfato (PBS) pH 7.2. Parte deste material era utilizada para confecção de lâminas como antígenos para a IFI utilizando anticorpos monoclonais e parte era adicionada o EDTA 0,01M para procedimentos de eletroforese e outra parte estocada a -20°C para a extração de DNA.

5.8 Ensaio Imunológicos e bioquímicos

5.8.1 Anticorpos monoclonais por imunofluorescência indireta (RIFI)

Parte da suspensão antigênica de promastigotas utilizadas neste ensaio, foi tratada com formol a 1%, para determinar a concentração de 1×10^5 a 1×10^7 células/mL a serem utilizadas como antígenos nos testes de IFI protocolo Técnico, fornecido pela Organização Mundial de Saúde (2002).

Era aplicado um volume de 20µl desta suspensão em lâminas de IFI, fixando-as em acetona (PA) gelada durante 10 minutos a temperatura ambiente, identificadas e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

No momento do uso:

Em seguida eram incubadas com PBS pH 7.2 e SFB (5%), por 10 minutos;

Adicionando-se a seguir os anticorpos monoclonais diluídos 1:1000 em ordem seqüencial e incubados por 30 minutos a 37°C;

A seguir lavados por 2 vezes com solução de PBS pH 7.2 e soro bovino fetal (2%) Então se adicionava o conjugado ligado com Isotiocianato de Fluoresceína e IgG le anti- mouse (A9044 SIGMA) diluído 1:32 em solução de PBS pH 7.2/SFB a 2% a 37°C por 30 minutos.

Foram feitas 2 lavagens sucessivas com a solução de PBS pH 7.2/SFB a 2%.

As lâminas eram levadas para secagem a 37°C e era adicionado uma solução de glicerina pH 9.6 e coberta com uma lamínula e incubada a 4°C “overnight” para posterior leitura no microscópio de imunofluorescência na objetiva de 40X.

O painel de anticorpos utilizados para a realizações desse teste foram os seguintes serodemas: *L. braziliensis complexo* (D3), *L. braziliensis* (B-12), *L. braziliensis* (B-18), *L. (b) braziliensis* (B-16), *L. (b) guyanensis* (B-19), *L. (b)/ panamensis* (B-5), *L. (b) / panamensis* (B-4), *L. (b) / panamensis* (B-7), *L. (b) / panamensis* (B-11), *L. (m) amazonensis* (M-3), *L. (m) venezuelensis* (P-9), *L. mexicana* (M-8), *L. mexicana / amazonensis* (M-7), *L. naiffi* (B1), segundo protocolo técnico fornecido pela Organização Mundial de Saúde (2002).

5.8.2 Mutilocus enzyme eletroforese (MLEE)

5.8.2.1 Eletroforese de isoenzimas

A análise do perfil de mobilidade eletroforética com isoenzimas, utilizou-se sete sistemas enzimáticos e em géis de agarose a 1% e as variações alélicas foram testadas com as seguintes enzimas: *Isomerases*: 6- phospho dehydrogenase glucose (6PDGH- E.C.1.1.1.44), mannose phospho-isomerase (MPI- E.C.5.3.1.8); glucophosphate-isomerase (GPI-E.C.5.3.1.9); *Transferases*: phosphoglucomutase (PGM-E.C.2.7.5.1); *Oxidoreductases*: glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PDH- E.C.1.1.1.49), isocitrate dehydrogenase (IDH-NADP- E.C.1.1.1.42); *Lyases*: aconitase (ACON-E.C.4.2.1.3), de acordo com Smith et al., (1972), Cupolillo et al.,(1994,1997, 1998,1999, 2003), e Echeverria; Tibayrenc (1999).Cada isolado foi comparado com espécies de referência, (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1990), Quadro 1. A preparação dos isolados para caracterização isoenzimática e as condições de eletroforese e revelação foram processadas de acordo com metodologia descrita por Cupolillo et al. (1994, 1997, 1998, 1999, 2003).

5.8.2.2 Preparação da amostra, execução da técnica

Alíquotas do lisado do extrato protéico foi feito através da solução de Triton 100X diluído 1:20,

Foi incubada em banho de gelo durante a execução dos testes,.

5 µl do lisado de cada amostra do estudo foi aplicado no gel de agarose a 1% e adicionado 5 µl de azul de Bromofenol a 1% no “spot” do meio da fita para servir de guia de corrida de eletroforese.

Foi adicionado o tampão de corrida específico na cuba e ajustada a temperatura de corrida para 5°C a 240-300 V, durante 40 minutos.

Após a corrida foram adicionados substratos (20mg/mL), co-enzimas (20mg/mL) e MgCl₂ (0,4%).

A coloração do gel era feita com {3-[4,5-Dimetythiazol-2-yl]-2-5 Diphenyl-Tetrazolium Bromide} MTT (M1228-SIGMA®) preparado uma solução na concentração de 3mg/mL e Phenazine Methosulphate PMS(P9625-SIGMA®) preparado na concentração de 2mg/mL e adicionado 20 mL destas soluções sob a superfície do gel e incubado durante 30 minutos a 37°C.

A reação era interrompida pela adição de uma solução de Ácido acético 1M, recobrando toda a superfície do gel. Registrado por fotografia.

5.9 Controles

Foram utilizadas para a realização deste estudo, cepas-referência da OMS das seguintes espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* causadoras da LTA a *Leishmania (Viannia) braziliensis* (VIANNA, 1911), *L.(V.) guyanensis* (FLOCH, 1954), *L.(V.) naiffi*, (LAINSON; SHAW, 1989).

Na avaliação da especificidade dos iniciadores obtidos para o subgênero, também foram utilizadas as cepas-referência da ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE de espécies do subgênero *Leishmania* de ocorrência nas Américas: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, causadora de LTA (Quadro1).

O controle de qualidade do perfil de MLEE por amostragem aleatória pelo Laboratório de referencia para tipagem de *Leishmania* e Coleção de *Leishmania* spp (CLIOC/FIOCRUZ).

Cepas de Referencia	
<i>L. (V) braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1975/M4147
<i>L. (V.) naiffi</i>	MDAS/BR/1979/M5533
<i>L. (L.) amazonensis</i>	IFLA/BR/1967/PH8

Quadro 1 - Utilização de cepas de referência de espécies de *Leishmania*

5.10 Análises dos dados

Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de tabelas ou gráficos incluindo também o uso de algumas medidas descritivas como mínimo, máximo, média e desvio padrão. Para testar a suposição de normalidade das variáveis envolvidas no estudo foi aplicado o teste de Shapiro Wilk. Para análise comparativa das variáveis quantitativas foi utilizado t-student quando observado o pressuposto de normalidade, quando não, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para a análise comparativa entre as variáveis qualitativas foi aplicado o teste de qui-quadrado, e quando necessário Fisher. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. A análise dos dados foi realizada com o auxílio dos softwares, Microsoft Excel e o R v2.10.0.

5.11 Aspectos éticos

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMTAM sob o número 1830/2006. Todos os participantes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

6 RESULTADOS

Um total de 209 pacientes que tiveram o diagnóstico clínico e laboratorial de LTA foi incluído no estudo. No exame parasitológico direto, por escarificação de borda de lesão 178/209 (85%) foram positivos. Foi realizada punção aspirativa e/ou biópsia de lesão suspeitas de LTA, semeadas em meio de cultivo, todas positivas (Tabela 1).

Tabela1 – Distribuição de testes parasitológicos, dos pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar americana, 2006 a 2008.

TESTES	POSITIVO (+)		NEGATIVO (-)	
	n	%	n	%
Exame Direto	178	85	31	15
Biópsia	21	10	-	-
Punção aspirativa	188	90	-	-

Nota:

n – Número de exames realizados

% - frequência relativa

A maior parte dos isolados, 61% (128/209), foi procedente de pacientes que residiam em Manaus, seguidos da região metropolitana de Manaus, Roraima, Rondônia e Pará com 39% (81/209). A predominância dos pacientes foi do gênero masculino, com 74% (155/209) entre gêneros não houve diferença estatisticamente significativa com p-value= 0,7947, (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição dos pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar americana ,segundo faixa etária e gênero, 2006 a 2008.

Faixa etária	Gênero			
	Masculino		Feminino	
	n	%	n	%
0-10	10	4,8	09	4,3
11-20	34	16,3	13	6,2
21-30	34	16,3	21	5,2
31-40	22	10,5	10	4,8
41-50	27	12,9	03	1,4
51-60	13	6,2	03	1,4
61-70	04	1,9	01	0,5
>70	02	0,9	03	1,4
Média	18,3		6,6	
Mediana	18,3		5,3	
Desvio Padrão	12,8		4,6	

As localidades de origem dos pacientes foram: 63% (131/209) do Município de Manaus (AM) nas localidades da BR174 38%(79/209), principalmente do KM021 Ramal do Pau-Rosa com 25%(52/209). Os municípios da região metropolitana foram: Autazes; Careiro; Itacoatiara; Itapiranga; Manacapuru, Manaquiri; Presidente Figueiredo; Rio Preto da Eva. Os demais procederam de: Anamá; Barcelos; Boa Vista do Ramos; Coari; Nova Olinda do Norte; Parintins; Rio Juruá; Tefé; Urucará, no Amazonas; Cacoal - Rondônia; Mucajaí – Roraima e do Pará (Figuras 5, 6).

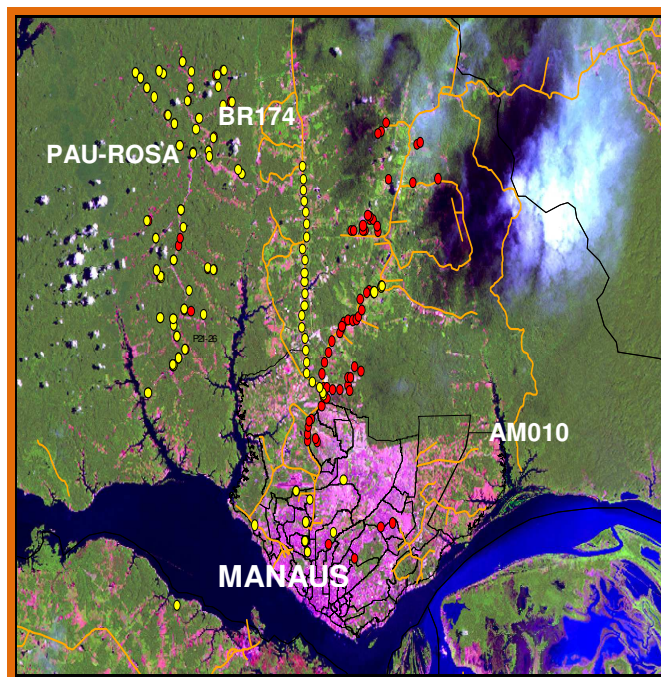


Figura 5 – Distribuição das locais de procedência dos pacientes com leishmaniose tegumentar americana, residentes em Manaus, realizado com georeferenciamento.

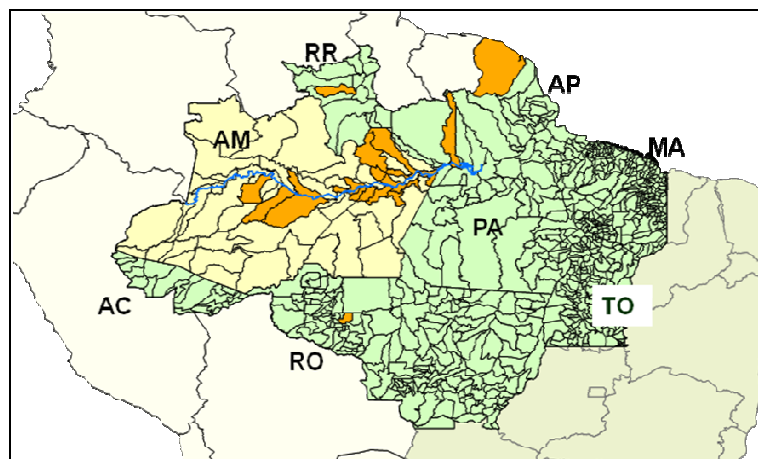


Figura 6 – Distribuição de pacientes com leishmaniose tegumentar americana, procedentes de Manaus, Região Metropolitana de Manaus, Rondônia, Roraima e Pará.

As 209 amostras isoladas foram caracterizadas com anticorpos monoclonais e identificadas as seguintes espécies: *Leishmania (Viannia) guyanensis*, representando 83% (174/209), *L. (V.) braziliensis*, com 19% (40/209); *L. (L.) amazonensis*, 14% (30/209) e *L. (V.) naiffi*, 6% (13/209) (Figura 7, Apêndice C).

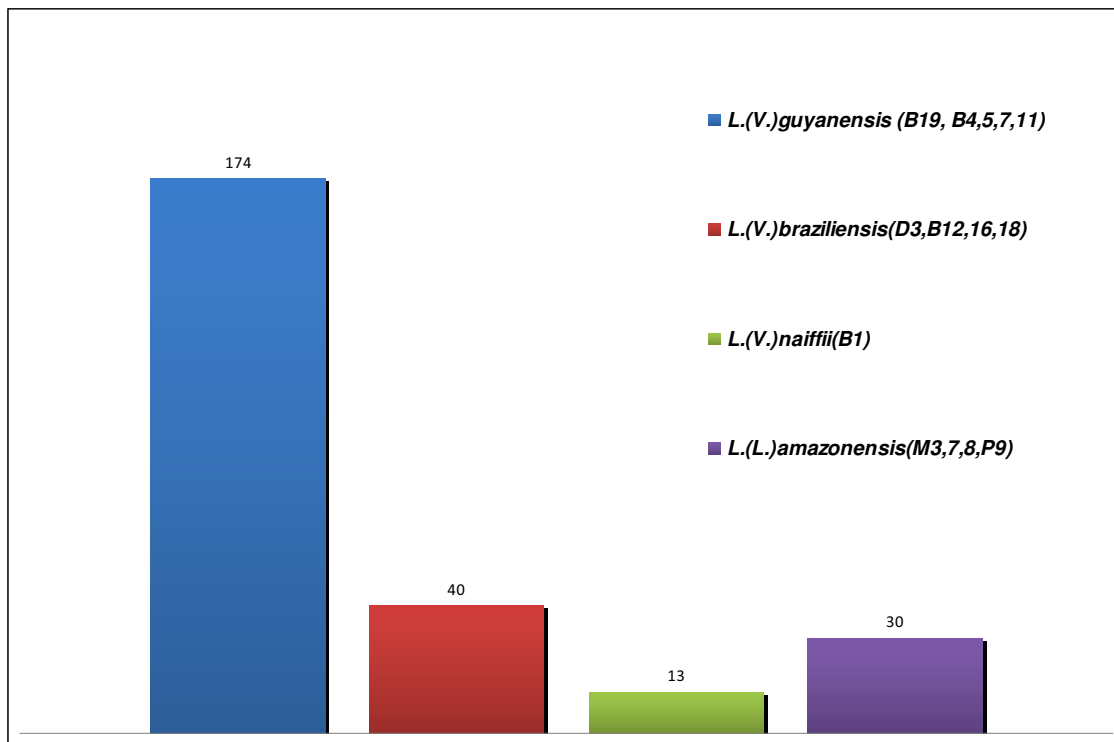


Figura 7 - Distribuição dos isolados identificados por espécie de *Leishmania* spp por teste de reação de Imunofluorescência indireta utilizando anticorpos monoclonais, 2006 a 2008

A caracterização das amostras por MLEE, detectou que as enzimas utilizadas neste estudo tiveram o seguinte desempenho quanto a identificação das espécies de *Leishmania* 6PDGH identificou 49%(94/209); PGM 25%(52/209); G6PDH 23%(48/209); GPI 21%(45/209); ACON 20%(40/209); IDH-NADP 17%(35/209) e MPI 2%(4/209) (Figura 8). Não houve diferença estatisticamente significativa (p-valor 1,0000) entre as enzimas PGM e 6PDGH,

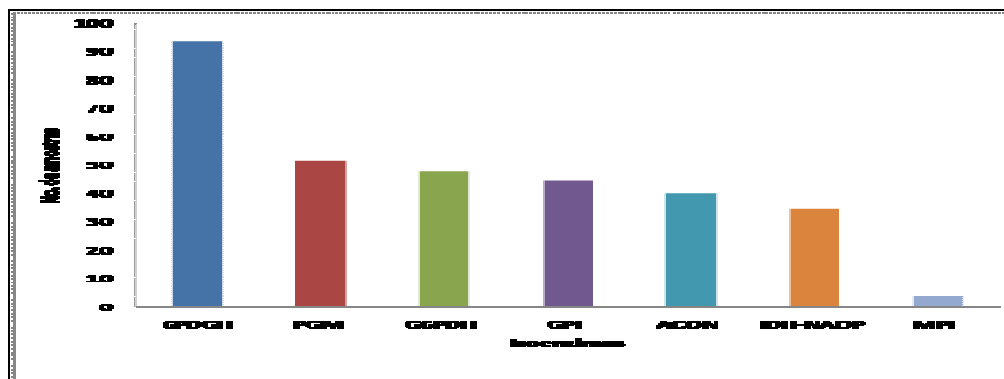


Figura 8 - Distribuição de desempenho das enzimas que identificaram espécies de *Leishmania* spp Por testes de multi locus Enzyme Electrophoresis, 2006 a 2008

Na caracterização por MLEE maior frequência de alelos com as enzimas: 6PDGH 44,98% (94/209) que identificou 4% (9/209) de *L(L.) amazonensis*; 5% (10/209) de *L(V.) braziliensis*; 32% (66/209) de *L(V.) guyanensis* e 2%(4/209) de *L(V.) naiffi*;

Com PGM 24,88% (52/209), 3%(6/209) de *L(L.)amazonensis*, 1,5%(3/209) de *L(V.)braziliensis*; 21%(44/209) de *L(V.)guyanensis* e 0%(0/209) de *L(V.)naiffi*;

G6PDH 22,97% (48/209),1% (2/209) de *L(L.)amazonensis*,2%(4/209) de *L(V.)braziliensis*; 19%(40/209) de *L(V.)guyanensis* e 1%(2/209) de *L(V.)naiffi*;

GPI 21,53% (45/209), 3% (6/209) de *L(L.)amazonensis*, 3%(7/209) de *L(V.)braziliensis*; 13%(27/209) de *L(V.)guyanensis* e 2%(5/209) de *L(V.)naiffi*;

ACON 19,15% (40/209), 0,5% (1/209) de *L(L.)amazonensis*, 1,5%(3/209) de *L(V.)braziliensis*; 17%(36/209) de *L(V.)guyanensis* e 0%(0/209) de *L(V.)naiffi*;

IDH-NADP 16,75% (35/209) 0% (0/209) de *L(L.)amazonensis*, 3%(7/209) de *L(V.)braziliensis*; 12%(24/209) de *L(V.)guyanensis* e 2%(4/209) de *L(V.)naiffi*;

E MPI 1,91% (4/209); 2% (4/209) de *L(L.)amazonensis*,0 %(0/209) de *L(V.)braziliensis*; 0%(0/209) de *L(V.)guyanensis* e 0%(0/209) de *L(V.)naiffi*. (Figura 9). O controle de qualidade foi realizado CLIOC/FIOCRUZ em 15% (30/209) dos isolados com reprodutibilidade dos resultados.

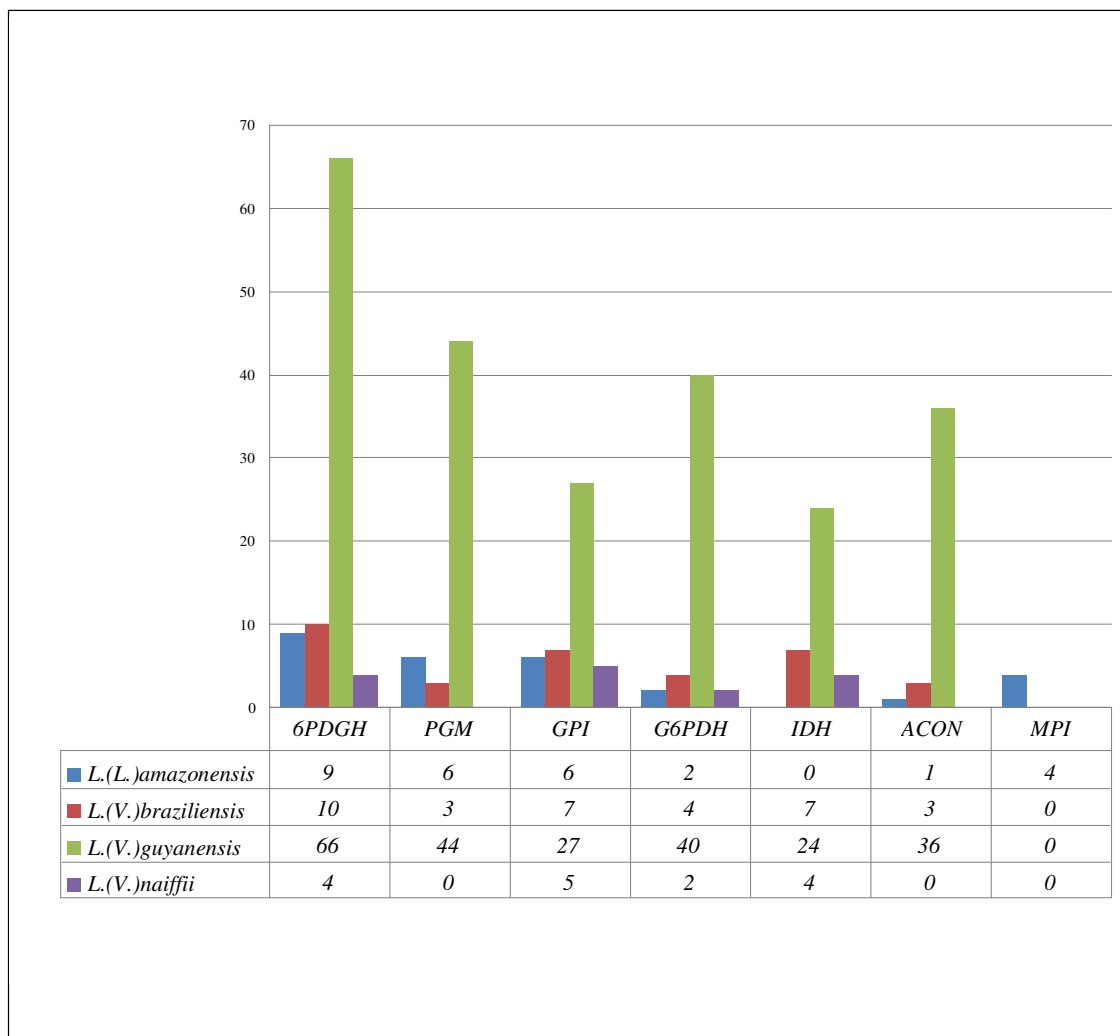


Figura 9 - Distribuição por espécie de *Leishmania* spp identificadas por testes de Multi locus Enzyme Electrophoresis, 2006 a 2008

Nas identificações das espécies de *Leishmania* spp., utilizando as duas técnicas RIFI e MLEE, observou-se em 12%(26/209)isolados a presença de mais de uma espécie do parasito, caracterizando a ocorrência de infecções mistas (Figura 10)

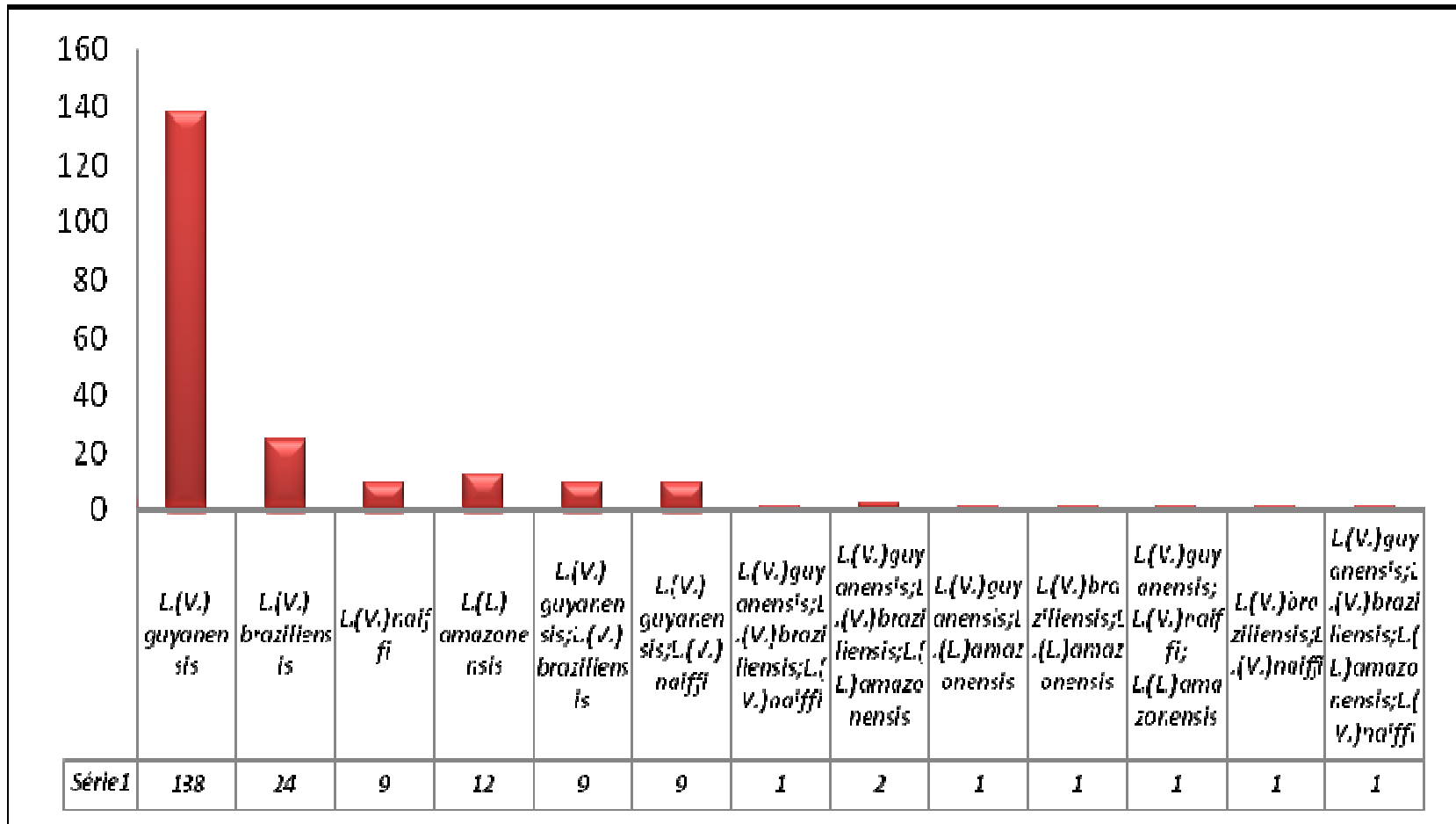


Figura 10- Distribuição das espécies de *Leishmania* spp identificadas pelos testes de reação de Imunofluorescência indireta utilizando Anticorpo Monoclonais, de Multi locus enzyme Electrophoresis , 2006 a 2008.

Do total das amostras pesquisadas, 12% (26/209) dos pacientes apresentaram infecções mistas: 4% (9/209) com *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*; 4% (9/209) com *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) naiffi*; 0,5 % (1/209) com *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) naiffi*; 1% (2/209) com *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*; 0,5% (1/209) com *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*; 0,5% (1/209) com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*; 0,5% (1/209) com *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi* e *L. (L.) amazonensis*; 0,5% (1/209) com *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) naiffi* e *L. (L.) amazonensis*, 0,5% (1/209) *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) naiffi* (Figura 11).

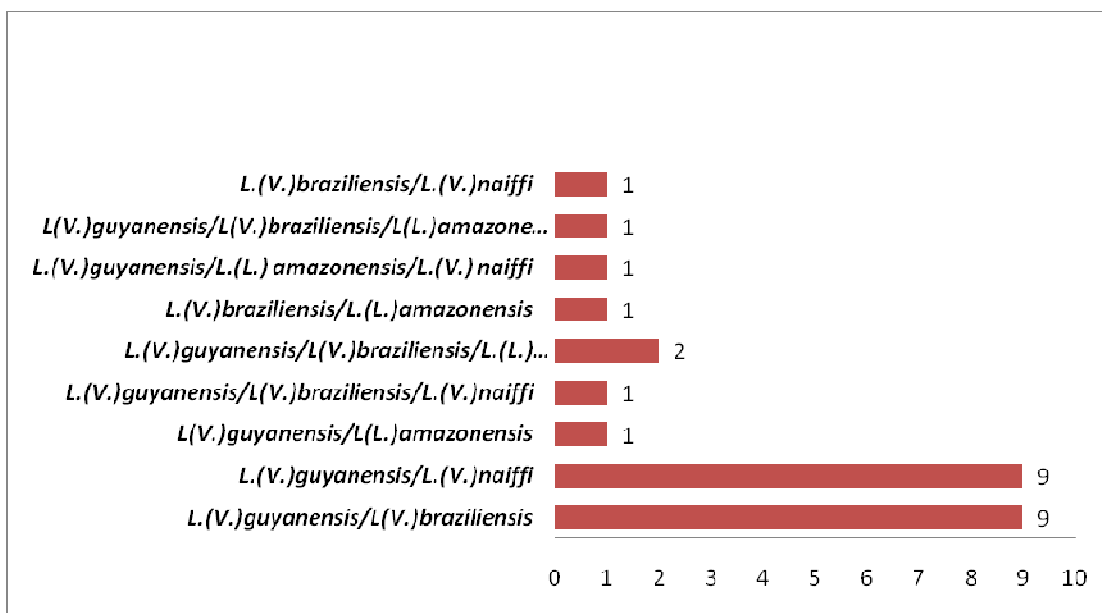


Figura 11 - Distribuição das espécies de *Leishmania* spp identificadas através dos testes de reação de Imunofluorescência indireta utilizando anticorpos monoclonais e de Multi locus enzyme Electrophoresis nos isolados com infecção mista, 2006 a 2008

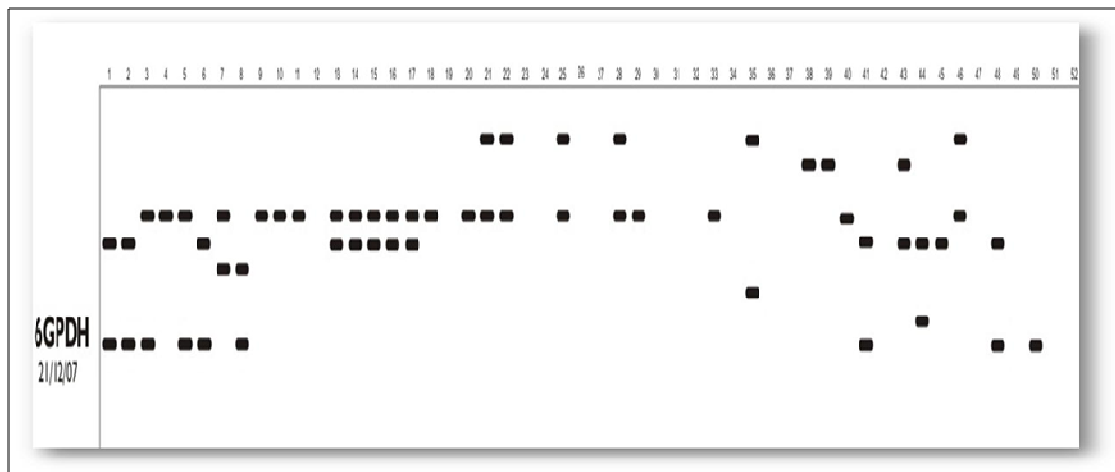


Figura 12 - Representação diagramática dos padrões de multi locus enzyme Electrophoresis em gel de agarose a 1%, enzima 6GPDH

Legenda:

linha 1-: *L. (L.) amazonensis*;

linha 2, *L. (V.) naiffii*;

linha 3, *L. (V.) gyuanensis*;

inha 4, *L. (V.) braziliensis*;

linhas 5, 6, 7 e 8, infecções mistas.

7.DISSCUSSÃO

A leishmaniose tegumentar americana constitui um grave problema de saúde pública e está amplamente distribuída em todos os estados federados, sendo a *L. (V.) braziliensis* considerada a espécie de maior importância, responsável por causar maioria dos casos de LTA no país (BRASIL, 2007).

Os pacientes deste estudo foram provenientes de áreas consideradas endêmicas da doença. Foi observada a prevalência de LTA em indivíduos do sexo masculino e adultos jovens, com idade menor de trinta anos, trabalhadores da zona rural. Este perfil de ocorrência é encontrado no país, onde a LTA atinge predominantemente indivíduos do sexo masculino em idade produtiva. O registro da doença, em geral, está associado a áreas rurais, sobretudo em indivíduos que realizam atividades agrícolas, relacionadas a exploração e desmatamentos em florestas (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2002).

Um problema observado em Manaus, assim como em outros grandes centros, diz respeito ao local de origem da infecção relatada pelos indivíduos. Frequentemente, não se conseguem correlacionar às informações obtidas pelos pacientes com os dados constantes nas fichas de notificações e prontuários, devido à incongruência destes. Em sua maioria, a transmissão da doença em moradores da zona urbana ocorre quando estes visitam sítios nas rodovias AM-010 (Manaus-Rio Preto da Eva-Itapiranga-Itacoatiara) e BR-174 (Manaus-Presidente Figueiredo - Boa Vista) ou casas de parentes e amigos em áreas endêmicas de ambientes florestais; entretanto, nem sempre estes dados são informados, gerando dúvidas quanto ao local em que ocorreu a infecção (FIGUEIRA *et al.*, 2008).

Nos pacientes avaliados nesse estudo, o exame direto na borda das lesões suspeitas de LTA apresentou um significativo índice de positividade, ao contrário de outros trabalhos, onde a média é em torno de sessenta por cento (BRASIL, 2007; REIS *et al.*, 2009; SAMPAIO *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2000, 2001). Há de se considerar também o tempo entre o aparecimento da lesão e o diagnóstico que no Brasil de um modo geral a população mais acometida e que está via de regra, na periferia das cidades ou em comunidades do interior cujo acesso aos serviços de saúde são muito complicados (MARZOCHI *et al.*, 1994).

Em Manaus e no estado do Amazonas por ser uma área endêmica da doença, a população é já esclarecida de que a ocorrência de lesões que não cicatrizam no período de duas semanas leva a procura dos postos de saúde para diagnóstico embora ainda utilizem muitos tratamentos de conhecimento popular, mas também podem evoluir para a forma mucosa. Neste estudo, o tempo médio de diagnóstico foi de três semanas e com isto foi possível ter alta positividade. Neste estudo o tempo médio de diagnóstico foi de três semanas e com isto foi possível ter alta positividade. O que denota conhecimento popular. Contudo ressaltar a possibilidade de encontro do parasito por técnicas moleculares em cicatrizes de pacientes tratados após uma década, e feito seguimento pós tratamento, (MENDONÇA et al. 2004, 1995, 1988; SCHUBACH et al., 1988).

A positividade da pesquisa direta, neste estudo, foi relacionada ao diagnóstico precoce. Os parasitos são mais abundantes em lesões causadas por *L. (L.) amazonensis*. O encontro do parasito é mais difícil nos casos em que o agente etiológico é a *L. (V.) braziliensis*, bem como, nos casos de lesão mucosa. Tornam-se também ainda mais difícil de visualizá-los nas formas verrucosa e mucosa crônica, com pouca atividade da doença (SAMPAIO et al., 1994, 2002).

A visualização de amastigotas em lâminas coradas por Giemsa ou hematoxilina/eosina, em material de esfregaço e/ou imprint, são procedimentos rápidos, podendo diagnosticar lesões recentes. É importante para o diagnóstico laboratorial e clínico que se faça a pesquisa direta do parasito com maior brevidade, tendo em vista que as espécies de *Leishmania* além de possuírem mecanismos de escape muito eficazes, possuem características próprias de tempo de reprodução no interior dos macrófagos (DA CRUZ, 2002).

O isolamento de parasito em cultura a partir de material obtido através de fragmentos de biópsia e/ou aspirado de lesão é considerado um método clássico para identificar as espécies de *Leishmania*, quer em infecções humanas, quer nas infecções dos reservatórios e vetores. Sabe-se que existe uma discrepância com relação ao êxito deste procedimento e a positividade das culturas é bastante variável na pesquisa (MARZOCHI et al., 1982; WEIGLE et al., 1987; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Na Amazônia há uma maior dificuldade de isolamento do parasito devido à grande contaminação de culturas favorecida pela elevada umidade e temperatura.

Outro fator que pode contribuir para o baixo rendimento do crescimento em meio de cultura pode ser a diversidade das espécies e as dificuldades em se adaptar aos meios de cultura (SILVA et al., 2006).

Na Amazônia Legal, estudos demonstraram que existem ocorrências de diversas espécies envolvidas no ciclo de transmissão da doença. Dentre as sete espécies que infectam o homem, destaca-se a *L. (V.) guyanensis* na sua maioria presente na Amazônia ocidental (SHAW, 1989; SHAW; LAINSON, 1976; 1987; SHAW et al., 2007). Resultados também encontrados por Naiff et al.,(1999, 1998) e Romero et al.,(2000, 2001a, 2001b, 2002a, 2002b, 2005). Esses achados são similares aos obtidos neste estudo, onde a ocorrência de *L. (V.) guyanensis* foi a mais observada. Sugerido que, apesar de *L.(V.) braziliensis* ser a mais encontrada no país (BRASIL, 2007) a *L. (V.) guyanensis* é a mais prevalente no Amazonas.

Os métodos de identificação e caracterização das espécies de *Leishmania* spp. principalmente através da RIFI com anticorpos monoclonais específicos, e através da eletroforese de isoenzimas (MLEE), sendo este último “ gold standard” permite a identificação de espécie (MARZOCHI et al., 1980; HANHAM et al., 1990; ISHIKAWA et al., 2002; RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2006). Essas técnicas podem ser de grande utilidade no prognóstico da doença, especialmente em áreas de elevada endemicidade, uma vez que, a variedade de manifestações clínicas da doença nas formas, cutânea, cutânea-mucosa, mucosa e muito raramente difusa fazem o elo com as espécies independente do esquema terapêutico (GREENBLATT et al., 1983; LLAÑOS-CUENTAS et al., 1984). Uma outra ferramenta é a utilização do georeferenciamento nas localidades em que os indivíduos contraíram a doença e sabendo sobre as espécies de mais ocorrência, fazer prevenção da doença mucosa e/ou a doença difusa (GUERRA, 2006).

Pode-se usar outras ferramenta de georeferenciamento das localidades em que os indivíduos contraíram a doença e sabendo sobre as espécies de mais ocorrência, fazer prevenção da doença mucosa e/ou a doença difusa (GUERRA, 2006).

A eletroforese de isoenzimas (MLEE) como padrão ouro para identificar *Leishmania* (CUPOLLILLO, 1994) é também utilizada por outros autores para investigar variações intra-espécies em nível de diferentes regiões endêmicas e hospedeiros fazendo a identificação de diferentes espécies usando loci de diferentes enzimas (LE BLANCO; PETERS, 1986).

Romero et al. (2002, 2001b) utilizaram ambos os métodos para a caracterização dos isolados e verificaram que com o anticorpo monoclonal serodema B19 específico para *L. (V.) guyanensis*, não reagiu. Ao contrário dos achados desse estudo que obtiveram com o serodema B19 a identificação da *L. (V.) guyanensis*, confirmada por isoenzimas. Em amostras isoladas no Equador com serodema B11 foi identificada *L. (V.) guyanensis*, em vez *L. (V.) panamensis*, esses achados foram confirmadas por isoenzimas e PCR (ROMERO, et al.,(2001a, 2002a, 2002b, 2005). A *L. (V.) guyanensis*, neste estudo, também mostrou reatividade para B11. Isto reforça a hipótese de Bañhus et al., (1999) que analisaram os genes de *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* e concluíram que são espécies similares.

A reatividade para serodemas B4, B5, B7, B11 considerada espécie específicos pelo protocolo técnico, cedido pelo TDR/WHO (2002) para *L(V.) panamensis*, neste estudo foram reativas através de MLEE para *L. (V.) guyanensis*. Nesse caso, há uma concordância com Bañuls et al., (1999), que constataram ser a *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* espécies similares. Destaca-se, também, que até o momento não há relatos de *L. (V.) panamensis* no Amazonas. Na mesma linha de pensamento Saravia et al., (1998) também descreveram por estudos taxonômicos a similaridade entre as duas espécies *L(V)guyanensis* e *L(V)panamensis*.

Neste estudo as espécies *L(V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis* foram consideradas a mesma espécie e desta forma foi a principal espécie identificada em isolados de pacientes. A transmissão da *L. (V.) guyanensis* é registrada no norte da Bacia Amazônica (Amapá, Acre, Roraima, Amazonas e Pará), encontrada principalmente em florestas de terra firme. Vários mamíferos silvestres tais como a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) (LAINSON; SHAW, 1987), gambá (*Didelphis albiventris*) e roedores do gênero *Proechimys guyanensis* foram encontrados naturalmente infectados, indicando-os como possíveis reservatórios desta espécie de *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1972; LAINSON et al.,1979).

Estudos realizados na Bacia Amazônica (ARIAS; FREITAS, 1977; ARIAS et al.,1981) e em Manaus (ANDRADE, 1998; BARRET; SERNA, 1989) observaram *L. (V.) guyanensis*, em *Didelphis marsupialis*, na Amazônia este animal é vulgarmente denominado de mucura e no nordeste timbu. A presença desse animal em ambientes alterados mostra a adaptação do mesmo, e como que faz o elo entre a

floresta e o ambiente humano, podendo ser fonte de infecção para flebotomíneos (ANDRADE et al., 1998). Neste estudo, foi identificada pelos métodos de anticorpos monoclonais e MLEE (isoenzimas) a predominância da espécie de *L. (V.) guyanensis*, inclusive com padrão de infecção mista, em amostras de pacientes provenientes das comunidades do Pau Rosa, Cidade de Deus e AM010 que foram áreas de estudos daqueles autores (ANDRADE, 1998; BARRET; SERNA, 1989).

Romero et al.,(2000) chamaram atenção não apenas para a prevalência de *L.(V.)guyanensis* mas também para a presença de *L.(V.)braziliensis* na calha norte do estado do Amazonas, onde muito dos pacientes deste estudo foram oriundos pois o acompanhamento desses pacientes deve ser levado em conta e a identificação do agente etiológico é uma necessidade, para o prognóstico da doença

O isolado do paciente com co-infecção com HIV/aids foi identificada e caracterizada por anticorpos monoclonais e perfil de isoenzimas como *L. guyanensis*, espécie de maior prevalência no estado. *Leishmania* pode ter um comportamento oportunista no paciente imunodeprimido. Relatos na literatura mostram que casos de recidivas de leishmaniose em decorrência de imunossupressão induzida por drogas ou transplante, essa associação rara no passado, tornam-se a principal causa de notificação de casos de LV na Europa em pacientes portadores de HIV/aids (BITTENCOURT et al., 2003; BORGES et al., 1999; BOSQUE et al., 2000; ORSINI et al., 2002).

Em relação à aparente homogeneidade encontrada por MLEE em *L.(V.) guyanensis* em amostras oriundas de vários focos endêmicos na Amazônia. Nosso achados corroboram os dados de Figueira et al., (2008), que obtiveram resultados coincidentes através eletroforese de enzimas (eletromorfos), e confirmam os estudos anteriores de (CUPOLLILO,1994; GRIMALDI; McMAHON-PRATT,1996; NAIFF et al.,1998).

A concomitância de reatividade dos anticorpos monoclonais com serodemas de *L.(V.) panamensis* e com o serodema específico para *L.(V.) guyanensis* B19, nos mesmos isolados revelaram que há co-existência de ocorrência de variantes também denominadas por autores como híbridas de *L (V.) guyanensis* (BONFANTE-GARRIDO et al., 1992; SHAW et al., 1986,1987,1989; GRIMALDI et al., 1987, 1991; GRIMALDI JR; TESH, 1993; GRIMALDI JR, 1995; GRIMALDI JR ; McMAHON, 1996; SARAIVA et al. 1998; VRAY,1998; BASTRENTA et al. 2003; BRITO et al.,2009).

Ressalte-se aqui, que os isolados deste estudo foram coletados de uma única lesão e as boas práticas laboratoriais foram rigorosamente seguidas a fim de evitar possíveis contaminações. Bastrenta et al. (2003), utilizando técnica de PCR em isolados de LC em pacientes com lesões ativas, observou também infecções mistas pelos dois subgêneros *Leishmania*.(V.) e *Leishmania*.(L.) na mesma lesão e ainda com co-infecção por *T.cruzi* sendo que estes últimos encontrados em gota espessa do mesmo paciente (BUCKNER et al., 1997).

A LTA tem apresentado mudanças no padrão de transmissão. Considerada uma doença complexa por apresentar uma grande variedade de espécies de parasitos, vetores, reservatórios, assim como a relação parasito-hospedeiro envolvido e expressado em diferentes formas clínicas. No Amazonas no período de 1991 a 2000, foram registrados vinte e dois focos da LTA em Manaus (GUERRA et al.,2001). Um desses surtos ocorreu no conjunto Hiléia, localidade de área urbana na cidade (PAES et al.,1991, 1998).

Ressalta-se neste estudo o registro de um percentual significativo de infecções mistas provenientes de uma única lesão. Infecções mistas e/ou a heterogeneidade clonal puderam ser detectadas em estudos com análise de zimodemas. Portanto, em áreas endêmicas onde existem espécies distintas de *Leishmania* e sua classificação taxonômica ainda não esta bem definida, a possibilidade de infecções mistas não deve ser descartada (PACHECO et al., 1990,1994, 1995).

A associação de métodos que permitam estudar propriedades e testar hipóteses através de estudos de identificação de espécies de parasito de *Leishmania* em áreas endêmicas, devem considerar a possibilidade de verificar infecções mistas. MLEE, anticorpos monoclonais, PCR convencional e análise de fragmentos de kDNA são ferramentas úteis na identificação de infecções causadas por uma ou mais espécies.

Silveira et al., (1984), identificaram pela primeira vez a infecção mista com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* através de isoenzimas em amostras de pacientes oriundos do Pará. A associação de métodos que permitam estudar propriedades e desvelar limitações do escopo e hipótese de estudo de identificação de espécies de parasito de *Leishmania* em áreas endêmicas sempre devem considerar a possibilidade de encontrar infecções mistas e MLEE, anticorpos monoclonais,PCR convencional e análise de fragmentos de kDNA são úteis tanto na

identificação de infecções causadas por uma espécie quanto por mais de uma.

Na década seguinte, Strelkova et al., (1990a,1990b, 1997) comprovaram a ocorrência de infecção mista por *L. turanica*, *L. gerbeli* e *L. major* em amostras isoladas de humano e roedores, oriundos da Rússia. Já Al-Diwany et al., (1995) relataram a infecção mista em material de medula humana com as espécies de *L. donovani* e *L. major*, considerado também o primeiro achado desse tipo infecção no Iraque. No mesmo ano, no Sudão, Ibrahim et al.,(1994) reportaram também a presença de infecções mistas, em amostra de pacientes com LV e detectaram *L. donovani* e *L. aethiopica* através das técnicas de isoenzimas e PCR.

Abdullah et al., (1998), em estudos experimentais com cultura de macrófagos humanos, comprovaram a viabilidade de co-infecção entre espécies diferentes de *Leishmania* spp (do Velho e Novo Mundo). Esses autores avaliaram a infecção mista nas espécies de *L. amazonensis*, *L. donovani*, *L. infantum* e verificaram que a ocorrência de infecções mistas podem dificultar o diagnóstico e a terapia (PRINA et al., 1993; VOLF et al., 2007).

Outra evidência de infecção mista foi feita por (MADEIRA et al., 2006), que descreveram o primeiro caso de co-infecção de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* em amostras isoladas de lesões cutâneas, de sangue e de linfonodos de cão com infecção natural, procedente da cidade do Rio de Janeiro, Brasil, confirmada através da análise molecular por PCR e de hibridização.

Infecção mista com outros protozoários que são transmitidos também por vetores, tem sido relatada, como por exemplo infecções por *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* encontradas em pacientes portadores de malária na região amazônica (LORENZETTI et al., 2008). Em Manaus, 5,3% dos casos de malária ocorrem infecções mistas, com possibilidade de esses dados estarem subnotificados (COSTA et al., 2008). Fato também observado com maior prevalência em Rondônia (ALVES et al., 2002). A análise de amostras não identificadas pela microscopia e testadas através da PCR detectou 10% de infecções mistas causadas pelo *Plasmodium malariae* (CAVASINI et al., 2000). A ocorrência da infecção mista com esta espécie, no Mato Grosso, chegou a 11,9%, utilizando a técnica de PCR (SCOPEL et al., 2004).

Neste contexto, é relevante o desenvolvimento de aplicações e abordagens que possam detectar o parasito com alta sensibilidade e distinguir as diferentes espécies de leishmânias (RODRIGUEZ et al., 2002). Além disso, a possibilidade de

infecções mistas, contendo outros membros da ordem Kinetoplastida ou mais de uma espécie do gênero *Leishmania*, torna essencial a identificação taxonômica precisa em estudos de natureza diagnóstica e epidemiológica utilizando técnicas em associação de ferramentas novas e clássicas. (BARKER; BUTCHER, 1983; BRITO et al., 1993, 2000, 2001, 2009; IBRAHIM et al., 1994; SHAW et al., 1987;).

Evidências de infecção por híbridos de *Leishmania* também têm sido encontradas através de caracterização com anticorpos monoclonais, eletroforese de isoenzimas, cariotipagem e RAPD-PCR, para diferenciar o compartilhamento dos antígenos e as características genotípicas de duas espécies em termos parentais. O mecanismo pelos quais os parasitos se tornam híbridos ainda não está bem esclarecido e se isto pode contribuir para a diversidade genética encontrada na Amazônia, o que precisa ser mais bem investigado, devido a heterogeneidade genética dos parasitos de *Leishmania* que causam a LC na região em relação ao restante do país (SILVA et al., 2006; BRITO et al., 2009). Essa evidência foi também observada nesse estudo. As mesmas amostras tiveram um padrão de reatividades diferentes quando foi utilizado o anticorpos monoclonais reagiram como *L. (V.) panamensis* e por isoenzimas como *L. (V.) guyanensis*.

Nas últimas três décadas os avanços dos métodos bioquímicos e imunológicos particularmente os relacionados à identificação de *Leishmania*, permitiram a observação da variabilidade das espécies para os epidemiologistas e parasitologistas. Recentemente, novos métodos moleculares/ genéticos permitiram o aprimoramento dos estudos sobre o parasito e ao mesmo tempo operacionalizando-os em laboratórios de rotina, facilitando o seguimento da doença, principalmente em áreas endêmicas do país.

O achado mais relevante foi o elevado número de pacientes que apresentaram infecções mistas, particularmente quando se verifica que os isolados foram obtidos a partir de amostras clínicas coletadas de única lesão, corroborando com os achados de outros autores como SHAW *et al.*, (1986, 1987, 1989), GRIMALDI JR ;McMAHON-PRATT (1996), STRELKOVA et al., (1990a, 1990b, 1997), SARAVIA et al., (1998), VRAY (1998), BASTRENTA et al., (2003) e BRITO et al., (2009). A heterogeneidade observada em infecções mistas entre *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) naiffii* e *L. (L.) amazonensis* e sua capacidade de persistência concomitante, causando LTA, contrasta em particular com a homogeneidade de parasitos isolados em outras regiões do nordeste e sudeste do

Brasil (ANDRADE, 2004; BRITO et al., 1993,2009; BRANDÃO-FILHO et al., 1999; BRANDÃO-FILHO; SHAW, 2006; CUPOLILLO et al.,1997,1998, 2003;) encontraram na Zona da Mata Atlântica em Pernambuco, nordeste do Brasil, dez diferentes zimodemas em isolados de *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) shawi*, confirmando a co-existência de duas espécies que dividem o mesmo ecossistema e interferindo no polimorfismo genético natural das populações de *Leishmania* spp. nesta região endêmica.

Com base nos números de amostras de pacientes oriundos de várias localidades de região endêmica de LTA na Amazônia Ocidental, esta evidência demonstra que há uma tendência de urbanização da doença. Mais estudos são necessários para reforçar esta hipótese, assim como estudos sobre a caracterização da fauna de flebotomíneos e hospedeiros reservatórios envolvidos na manutenção ciclo zoonótico da LTA, o que possibilitará auxiliar os serviços de vigilância epidemiológica na adoção de medidas de vigilância e controle desta importante endemia na região Norte e no Brasil.

8 CONCLUSÕES

As espécies do parasito identificadas e caracterizadas na região foram *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) naiffi*.

L. (V.) guaynensis foi mais prevalente e também a espécie que apresentou maior associação com outras espécies em uma única lesão.

O expressivo índice de infecções mistas, evidenciado pela caracterização com anticorpos monoclonais e isoenzimas, demonstra a grande diversidade de espécies de *Leishmania* associadas à doença na região metropolitana de Manaus.

A identificação da grande variedade de espécies e ocorrência de infecções mistas na região contribui para um melhor seguimento terapêutico e para o melhor prognóstico da doença.

Há uma tendência de urbanização da LTA na região, coincidindo com a ocupação de áreas de floresta, decorrentes do crescimento desordenado.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, S. M. et al. Mixed infection of human U-937 cells by two different species of *Leishmania*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 2, p. 182-188, 1998.

AL-DIWANY, L. J. et al. Concomitant natural infection with *L. donovani* and *L. major*: a case report from Iraq. **Sozial- und Praventivmedizin**, Basel, v. 40, p. 234–238, 1995.

ALEXANDER, B. et al. Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Northern Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, p. 387-395, 1992.

ALVES, F. P. et al. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 66, p. 641-648, 2002.

ANDRADE, M. S. **Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil**. 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2004.

ANDRADE, S. L. **Leishmaniose tegumentar americana em área de ocupação recente a periferia da Cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil**. 1997. 206 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1998.

ARIAS, J. R.; FREITAS, R. A. On the vectors of cutaneous leishmaniasis in the Central Amazon of Brazil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 7, p. 507-527, 1977.

ARIAS, J. R.; NAIFF R. D. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 279-286, 1981.

AZEVEDO, A. C. R. et al. Studies on the sandfly fauna of Samuel ecological station, Porto Velho Municipality, Rondônia State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, p. 509-512, 1993.

AZEVEDO, A.C.R. Natural infections of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes ; Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *braziliensis* complex in Baturité, Ceará State, Northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, p. 251-257, 1990.

BADARÓ, R. et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **Journal of Infect Diseases**, Chicago, v.154, p.639-649, 1986.

BAÑULS, A. et al. Genetic analysis of *Leishmania* parasites in Ecuador: Are *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V) guyanensis* distinct taxa? **American Journal Tropical and Hygiene**, Baltimore, v. 5, p. 838-845, 1999.

BARKER, D. C.; BUTCHER, J. The Use of DNA probes in the identification of Leishmânias: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. **The Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 77, p. 285-297, 1983.

BARRET, T. V.; SENRA, M. S. Leishmaniasis in Manaus, Brazil. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 5, p. 255-257, 1989.

BASTRENTA, B. et al. Human mixed infections of *Leishmania* spp. and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a sub Andean Bolivian area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 255-264, 2003.

BITTENCOURT, A. et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis associated with AIDS. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 3, p. 229-233, 2003.

BONFANTE-GARRIDO, R. et al. Cutaneous leishmaniasis in western Venezuela caused by infection with *Leishmania venezuelensis* and *L. braziliensis* variants. **The Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 2, p. 141-148, 1992

BORGES, A. S. et al. Concurrent leishmaniasis and human immunodeficiency virus (HIV) infection: a study of four cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 32, p.182-185, 1999.

BOSQUE, F. et al. Distinct innate and acquired Immune Responses to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L.(Viannia) panamensis* infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 51, p. 533-541, 2000.

BRANDÃO FILHO, S. P.; SHAW J. J. Molecular tools versus parasite isolation for evaluating the hosts of *Leishmania braziliensis*. Carta em Resposta da carta SILVA EE, GONTIJO CMF E MELO MN. Response to Brandão - Filho and Shaw: Molecular markers for Leishmania diagnosis. **Parasitology**, London, v. 22, p.11, 2006.

BRANDÃO FILHO, S. P. et al. Epidemiological Surveys confirm an increasing burden of cutaneous Leishmaniasis in north-east Brazil. **The Transactions of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 93, p.488-494, 1999.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília: Ed. Ministério da Saúde, 2007. (Serie A. Normas e Manuais Técnicos).

_____, **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 5. ed. Brasília: Ed. Ministério da Saúde, 2000. (Serie A. Normas e Manuais Técnicos, 2000).

CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA (Brasil). Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária. **Leishmaniose tegumentar americana no Brasil: Ferida Brava**. Brasília: Ed. Ministério da Saúde, 1997.

_____. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral**: calazar. Brasília: Ed. Ministério da Saúde, 1996.

_____. **Guia de controle da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília: Ed. Ministério da Saúde 1994.

BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 14, n. 1365-3156, 2009.

BRITO, M. E. F. et al. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, n. 2, p. 203-206, 2001.

BRITO, M. E. F., et al. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Journal of clinical and laboratory of Immunology**, Edinburgh, v. 7, n. 2, p. 318-321, 2000.

BRITO, M. E. F., et al. Human cutaneous leishmaniasis due to a new enzymatic variant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* occurring in Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 4, p. 633-634, 1993.

BUCKNER, F. S. et al. *Trypanosoma cruzi* infection does not impair major histocompatibility complex class I presentation of antigen to cytotoxic T. lymphocytes, European. **Journal of Immunology**, Copenhagen, v. 27, p. 2541-2548, 1997.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. **Características da Transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana do Estado de São Paulo, Brasil. São Paulo.** 1999. 145 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 1999.

CAMPBELL-LENDRUM, D. H. et al. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 159-162, 2001.

CARDOSO, C. P. L. et al. Leishmaniose: métodos diagnósticos. **Folha Médica**, Rio de Janeiro, v. 117, n. 2, p.131-134, 1998.

CAVASINI, M. T. et al. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, western Brazilian Amazon ? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 33, p. 489-492, 2000.

COSTA, M. R. et al. Molecular diagnosing of malaria in a tertiary care center in the Brazilian Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n. 4, p. 381-355 , 2008.

CUPOLILLO, E. et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **Clinical Microbiological**, London , v. 41, n. 7, p.3126-3132, 2003.

CUPOLILLO, E., et al. Leishmaniose tegumentar americana na Amazônia: distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 32, Sup. 1, p. 243, 1999.

CUPOLILLO, E., et al.. Genetic Diversity in Natural Populations of New World. *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n.5, p. 663-668, 1998.

CUPOLILLO, E., et al. Genetic diversity among *Leishmania (Viannia)* parasites. **Annals of tropical medicine and parasitology**, Liverpool, v. 91, p. 617-626, 1997.

CUPOLILLO, E., et al. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 50, p. 296-301, 1994.

DA-CRUZ, A. M. et al. T cell mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: Long term evaluation alter therapy. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington v. 9, p. 251-256, 2002.

DA-CRUZ, A. M., et al. *Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. **Infection Immunology**, Oxford ,v. 62,p. 2614-2618, 1994.

DECKER-JAKSON, J. E.; TANG, D. B. Identification of *Leishmania* spp by radiorespirometry II: a statistical method of data analysis to evaluate the reproductibility and sensitivity of the technique. In: Biochemical characterization of *Leishmania*. **Proccedings Workshop Pan American Health Organization**, Washington, p. 205-245,1980.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative. Immunology, **Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, p. 305-318, 2004.

DIAS-SVERSUTTI, A. C. et al. Estudo preliminar da preferência alimentar de *Nyssomyia neivai* (Pinto) e *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) em área rural do Paraná. **Neotropical Entomology**, Londrina, v 36, p. 953-959, 2007.

DUMON, H. Identification des Leishmanies: outils actuels au service de la clinique et l'épidémiologie. **Medicine Tropical News**, Bethesda, v. 55, p.123-126,1995.

EL TAI, N. O. et al. *Leishmania donovani* intraspecific Polymorphisms of Sudanese Isolates Revealed by PCR-based Analyses and DNA Sequencing. **Parasitology Experimental**, New York, v. 97,p. 35-44 , 2001.

EVANS, D. A.. Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v.7, n. 3, p. 527-546, 1993.

_____. **Solutions culture medium. In- Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of Leishmania**, Geneva,WHO, v. 198, p. 28-32, 1989.(Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases/TDR,1211)

EVANS, D. A. et al. The isolation and characterization of *Leishmania braziliensis* subsp. From patients with cutaneous leishmaniasis acquired in Belize. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 78, p. 35-42, 1984.

FALQUETO, A.; SESSA, P. A. Leishmaniose Tegumentar Americana. *In*: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 1221-1233.

FALQUETO, A. et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no Município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, p. 155- 163, 1986.

FALQUETO, A. et al. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo state, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 499-500, 1991.

FALQUETO, A. et al. Novas Perspectivas sobre o Ciclo de Transmissão da Leishmaniose Tegumentar no Estado do Espírito Santo. *In*: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 30, 1994, Salvador. **Anais**, Salvador: Saraiva, 1994. p. 11-14.

FIGUEIRA, L. D. E. P. et al. Isoenzymatic characterization of human isolates of *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus, State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 512-514, 2008.

FOUQUE, F. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with changing patterns in the transmission of the human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 1, p. 35-40, 2007.

FRANÇA, F. et al. An outbreak of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 2, p. 169-174, 1991.

FRANKE, E. D. et al. Efficacy and Toxicity of Sodium Stibogluconate for Mucosal Leishmaniasis. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 113, p. 934-940, 1990.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Textos de Epidemiologia para vigilância ambiental em saúde/coordenação**. Brasília, 2002.

GARDENER, P. J. et al. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. II: Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 68, n. 3, p. 317-325, 1974.

GOMES, A. C. et al. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, p. 32-39, 1989.

GOMES, R. F. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. **Experimental Parasitology**, New York, v. 80, p. 681-687, 1995.

GONTIJO, B.; CARVALHO M. L. de. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GREENBLATT, C. et al. Monoclonal Antibodies for Serotyping *Leishmania* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 18, n. 1, p. 191-193, 1983.

GRIMALDI JR., R. G.; McMAHON-PRATT, D. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 37-42, 1996.

_____. Meetings on vaccine studies toward the control of leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, p. 553-556, 1995.

GRIMALDI JR., R. G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 6, p. 230-250, 1993.

GRIMALDI JR., R. G., et al. Characterization and Classification of *Leishmania* parasites from humans, Wild mammals and sand flies in the Amazon region of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 44, n. 6, p. 645-661, 1991.

GRIMALDI JR., R. G., et al. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodemes analysis using monoclonal antibodies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 36, n.2, p. 270-287, 1987.

GUERRA, J. A. O. et al. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil, Manaus, Amazonas, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 23, p.19-27, 2006.

GUERRA, J. A. O., et al. Leishmaniose tegumentar americana (LTA) – Avaliação de dois anos de trabalhos com reservatórios em área periférica da Cidade de Manaus. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 34, p. 220, 2001.

HANHAM, C. A. et al. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania*. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London. v. 85, p. 220, 1991.

IBRAHIM, M. E. et al. The polymerase chain reaction can reveal the occurrence of naturally mixed infections with *Leishmania* parasites. **Acta Tropica**, Basel, v. 57, p. 327–332, 1994.

IGLÉSIAS, J. D. F. **Aspectos médicos das parasitoses humanas**. Rio de Janeiro: Medsi, 1997. 483 p.

ISAZA, D. M. et al. Validation of the polymerase chain reaction for the diagnosis of human cutaneous leishmaniasis in north-west Colombia. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 96, p.165-168, 2002.

ISHIKAWA, E. A. et al. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 96, supl. 1, p. 111-121, 2002.

JACKSON, P. R. et al. Restriction Endonuclease analysis of *Leishmania* kinetoplast DNA characterizes parasites responsible for visceral and cutaneous disease.

American Journal Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 33, p. 808-819, 1984.

JACOBSON, R. L.; SCHNUR, L. F. Changing surface carbohydrate configurations during the growth of *Leishmania major*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 76, n. 2, p. 218-224, 1990.

JANEWAY, A. et al. **Imunobiologia: O Sistema Imune na saúde e na doença**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

JONES, T. C. et al. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Journal Infectious Diseases**, Chicago, v. 156, p. 73-83, 1987.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v.17, p. 279-289, 1999.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis the Neotropical *Leishmania* species. In: FEG, C.; KREIER, J. P.; WAKELIN, D. (Ed). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. 9. ed. London, 1998. v. 5, p. 242-266.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. et al. Further observations on *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae), the sandfly vector of *Leishmania (Viannia) lainsoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 3, p. 437-439, 1992.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. et al. *Leishmania (Viannia) shawi* sp.n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v. 64, p. 200-207, 1989.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences**, London, v. 321, p. 389-404, 1988.

_____. Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 18, p. 47-56, 1985.

LAINSON, R. et al. *Leishmania* In phlebotomy sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the Royal**

Society of London Biological Sciences, London, v. 206, n. 1164, p. 307-318, 1979.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World: Taxonomic problems. **British medical bulletin**, London, v. 28, p. 44-48, 1972.

LASKAY, T. et al. Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 89, p. 273-275, 1995.

LE BLANCQ, S. M.; PETERS, W. *Leishmania* in the Old World: IV The distribution of *L. donovani sensu lato* zymodemes. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 80, p.367-377, 1986.

LLAÑOS-CUENTAS, A. et al. Possible risk factors in the development of Mucosal lesions in leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 2, p. 295, 1984.

LOPEZ, M. et al. Diagnosis of *Leishmania* using the Polymerase Chain Reaction: a simplified procedure for field work. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 49, p. 348-356, 1993.

LOPEZ, M. et al. The use of nonradioactive DNA probes for the characterization of *Leishmania* isolates from Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 38, p. 308-314, 1988.

LORENZETTI, A. et al. Mixed Plasmodium falciparum infections and its clinical implications in four areas of the Brazilian Amazon region. **Acta Tropica**, Basel, v. 107, n. 1, p. 8-12. 2008.

MADEIRA, M. F. A. et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 100, p. 442-445, 2006.

MARSDEN, P. D. Personal experience with diagnostic and therapeutic aspects of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Três Braços. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 485-487,, 1994.

MARZOCHI M. C. A. et al. Leishmaniose tegumentar americana. *In*: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999. cap. 3, p. 39-64.

MARZOCHI M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, Supl. 2, p. 359-375, 1994.

MARZOCHI M. C. A. et al. Vaccum Aspiratory puncture system for *Leishmania* culturing, isolation and transport. Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 301-303, 1993.

MARZOCHI M. C. A. Leishmanioses no Brasil. As Leishmanioses Tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 63, p. 82-104, 1992.

MARZOCHI M. C. A. et al. Avaliação de critérios diagnósticos na leishmaniose tegumentar em áreas de ocorrência de *Leishmania braziliensis* no Rio de Janeiro, Brasil. *In*: REUNIÃO DE PESQUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS, 9., 1992, Caxambu, MG. **Anais...** São Paulo: Saraiva, 1992. p. 82-104.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Reação de Imunofluorescência Indireta e intradermoreação de Montenegro para a leishmaniose Tegumentar Americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudos comparativos dos resultados observados em 1974 e 1978. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 22, p. 97-155, 1980.

MAYRINK, W. et al. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 310, p. 807-818, 1995.

MAYRINK, W. et al. A Experimental vaccination of dogs against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, Supl. 1, p. 159, 1988.

MAYRINK, W. et al. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.73, p. 385-387, 1979.

McMAHON-PRATT, D. et al. Studies employing monoclonal antibodies for the analysis of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *In*: COLLEGE INTERNACIONAL, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE: **Leishmania**:

Taxonomie et Phylogénese. Applications écoépidémiologiques, Montpellier: IMEEE, 1984. p. 173-178.

McMAHON-PRATT, D., et al. Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of *Leishmania braziliensis*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 129, n. 3, p. 926-927, 1982.

McMAHON-PRATT, D.; DAVID, J. Monoclonal antibodies that distinguish between species New World *Leishmania*. **Nature**, London, v. 291, p. 581-583, 1981.

MENDONÇA, M. G. et al. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure?. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, p.1018-1023, 2004.

MENDONÇA, S. C .F. et al. Characterization of Human T Lymphocyte mediated Immune Responses induced by a vaccine against American Tegumentary Leishmaniasis. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 53, p. 195-201, 1995.

MENDONÇA, S. C .F. et al. Indirect Immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, p. 347-355, 1988.

MEREDITH, S. E. O. et al. Development and application of the polymerase chain reaction for detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical material. **Archives Institute Pasteur**, Tunis, v. 70, n. 34, p. 419-431, 1995.

MILES, M. A. et al. Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 74, p.243–252, 1981.

MORALES, M. et al. Molecular tracking of infections by, *Leishmania infantum*. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, p. 104–107, 2001.

MOTAZEDIAN, H. et al. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Chicago, v. 96, p. 31-34, 2002.

NAIFF, M. F. et al. Leishmaniose tegumentar americana na Amazônia: distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 32, supl. 1, p. 243, 1999.

NAIFF, M.F. **Estudo demográfico da Leishmaniose Tegumentar na Amazônia e mapeamento geográfico dos agentes etiológicos na região**. 1998. 71 f. Dissertação (Mestrado) Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1998.

ORSINI, M. et al. Identification of *Leishmania chagasi* from skin in *Leishmania*/HIV co-infection: a case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 259-262, 2002.

PACHECO, R. S. et al. Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam v. 69, p. 197-209, 1995.

PACHECO, R. S. et al. The genus *Crithidia*: genotypic diversity among species. **Brazilian journal of medical and biological research**, Ribeirão Preto, v. 4, p. 71-82, 1994.

PACHECO, R. S. et al. Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. **Parasitology**, London, v. 100, p. 393-398, 1990.

PAES, M. G. et al. Sobre a ocorrência de leishmaniose tegumentar em rua de bairro de implantação antiga na cidade de Manaus (AM). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 31, p. 75, 1998.

PAES, M.G. **Estudo de quatro espécies de Lutzomyia França, 1924 (Diptera, Psychodidae), em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar Americana na periferia de Manaus (Amazonas) Brasil**. 1991. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas da Amazônia, Departamento de Entomologia, 1991.

PRINA, C. et al. Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes, **Journal of Immunology**, Copenhagen, v. 151, p. 2050-2061, 1993.

QUEIROZ, R. G. de et al. Cutaneous leishmaniasis in Ceará state in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 50, n. 6, p. 693-638, 1994.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p. 937-954, 2009.

READY, P. D. et al. Presence of *Psychodopygus wellcomei* (Diptera: Psychodidae), a proven vector of *Leishmania braziliensis braziliensis*, in Ceará State. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 2, p. 235-236, 1983.

REBELLO, J. M. M. et al. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em focos de leishmanioses, em área de ecoturismo do entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Brasil **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, p. 195-198, 2010.

REIS, L. C. et al. Cellular immune response profile in patients with American tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 23, n. 1, p. 63-69, 2009.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 349 p.

RODRIGUES, E. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American Leishmaniasis in an area of endemicity in Northeastern Brazil. **European Journal Clinical and Microbiology and infectious diseases**, Berlin, v. 40, p. 3572-3576, 2002.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, I. et al. Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. **Experimental Parasitology**, New York, v. 112, p. 44-51, 2006.

RODGERS, M. R. et al. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 71, p. 267-275, 1990

.ROGERS, W. O. et al. Detection of *Leishmania* within sand flies by kinetoplast DNA hybridization. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 39, p. 434-439, 1988.

ROGERS, W. O.; WIRTH, D. F. Generation of sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Leishmania mexicana amazonensis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 30, p. 1-8, 1987.

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**, Basel, v. 93, n. 1, p. 49-56, 2005.

ROMERO, G.A.S. et al. The rarity of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* among patients from the Manaus region of Amazonas state, Brazil, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE has cutaneous leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 96, n. 2, p. 131-136, 2002.

ROMERO, G.A.S. et al. Identification of antigenically distinct populations of *Leishmania (Viannia) guyanensis* from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. **Acta Tropica**, Basel, v. 82, p. 25-29, 2002.

ROMERO, G.A.S. et al. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. **Acta Tropica**, Basel, v. 3, p. 225-229, 2001.

ROMERO, G.A.S. et al. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L (V.) guyanensis* in Brazil: Clinical findings and diagnostic approach. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 32, p. 1304-1312, 2001.

ROMERO, G.A.S. et al. Identificação com anticorpos monoclonais de populações de *Leishmania (Viannia) guyanensis* antigenicamente distintas na região de Manaus, Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Brasília, v.33, sup. 1, 2000.

ROTUREAU, B. et al. Molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) guyanensis* in French Guiana. **European Journal Clinical and Microbiology**, Berlin, v. 44, n. 2, p. 468-473, 2006.

RYAN, L. et al. Leishmaniasis in Brazil. XXV. Sandfly vectors of *Leishmania* in Pará State, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 383-395, 1987.

SAMPAIO, R. N. et al. American cutaneous leishmaniasis associated with HIV/AIDS: report of four clinical cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 651-654, 2002.

SARAVIA, N. et al. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 1, p. 86–94, 1998.

SCHUBACH, A. et al. Cutaneous Scars In American Tegumentary Leishmaniasis Patients: A Site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and variability eleven years after Antimonial therapy and clinical care. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 58, n. 6, p. 824-827, 1988.

SCOPEL, K. K. et al. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacas - Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. **Acta Tropica**, Basel, v. 90, p.61-64, 2004

SHAW, J. J. et al. The aetiological agents of American cutaneous leishmaniasis in the municipality of Monte Negro, Rondônia state, western Amazonia, Brazil. **Annals Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 101, n. 8, p. 681-688, 2007.

SHAW, J.J., et al. A rapid sensitive method of the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 83, p.783-784, 1989.

SHAW, J.J.; LAINSON, R. Evolution, classification and geographical distribution. In: The Leishmaniasis: In: KILLICK-KENDRICK, R.; PETERS, W. **Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1987. v. 1, p. 1-120.

] SHAW, J. J. et al. Serodemas of *Leishmania braziliensis* complex with monoclonal antibodies using fluorescein labelled avidin In: *Leishmania* Taxonomie et Phylogenèse. Applications Écoépidémiologiques-Colloque International. **Journal Riox**, Montpellier, p. 179-183, 1986.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: XI. Observations on the morphology of *Leishmania braziliensis* and *mexicana* complexes. **Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 79, n. 1, p. 9-13, 1976.

SILVA, A. C. T. et al. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. **Tropical Medicine and International Health**. Oxford, v. 9, p. 1388-1398, 2006.

SILVEIRA, F. T. et al. Clinical and Immunopathological spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with special reference to the disease in Amazon, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 3, p. 239-251, 2004.

SILVEIRA, F. T. et al. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergii* n. sp. A new *Leishmania* parasite of man in the Amazon region. **Parasite**, Paris, v. 9, p. 43-50, 2002.

SILVEIRA, F.T., et al. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae), no estado do Pará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, p 18-22, 1991.

SILVEIRA, F.T., et al. Leishmaniose cutânea na Amazônia. Registro do primeiro caso humano de infecção mista, determinado por duas espécies distintas de Leishmânias: *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana amazonensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 272-275, 1984.

STRELKOVA, M. V. et al. Comparison of Some Molecular-genetic Techniques for identification of *Leishmania* circulating in natural foci of zoonotic cutaneous Leishmaniasis in the central Asia Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n.1, p.109-114, 1997.

STRELKOVA, M.V., et al. Isoenzyme identification and pathogenic characteristics of *Leishmania* isolated from natural foci of cutaneous leishmaniasis in the USSR. **Meditsinskaia parazitologija i parazitarnye bolezni**, Moscow, v. 5, p. 43-48, 1990.

STRELKOVA, M.V., et al. A new species of *Leishmania* isolated from the great gerbil *Rhombomys opimus*. **Parasitology**, London, v. 101, p. 327-335, 1990.

TAVARES-NETO, J. et al. Caracterização sociodemográfica da população do povoado de Cavunge-Bahia / Sociodemographic characterization of the Cavungeis village (Bahia, Brazil) population. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 27, n. 1/2, p. 60-75, 2003.

VEXENAT, J. A. et al. Epidemiological characteristics of american cutaneous leishmaniasis in an endemic region of the State of Bahia. III. Phlebotomine fauna. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 81 ,n. 3 .p. 393-201, 1986.

VOLF, P. et al. Increased transmission potential of *Leishmania major/ Leishmania infantum* hybrids. **International Journal for Parasitology**, New York, v.37, n.6, p.589-93, 2007.

VRAY, B. Biologie comparée des interactions entre les macrophages et *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp. et *Toxoplasma gondii*. **Annee Biologique**, Paris, v. 78, p. 221-232, 1998.

WEIGLE, K. A. et al. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **Journal Clinical and Microbiology**, v. 40, p. 601-606, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Leishmaniasis**. Geneva, 1990. (Technical Report Series, 701).

WORTH, D. F.; McMAHON-PRATT, D. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous leishmaniasis. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 60, n. 2, p. 67-72, 1983.

ZAIDI, N. et al. The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. **Archives of pathology and laboratory medicine**, Chicago, v. 127, n. 9, p. 1098-10105, 2003.

ZEMANOVA, E. et al. Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 70, n. 6, p. 613-617, 2004.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título : “CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES DE LEISHMANIA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - FORMA CUTÂNEA NA Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM)”

Investigador: **Leíla Inês de Aguiar Raposo da Câmara Coelho**

Instituição: **Fundação de Medicina Tropical do Amazonas** - Telefone: N.º de protocolo:

Patrocinador: **Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM)**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O abaixo assinado ou sob responsabilidade do seu parente próximo abaixo identificado ou, nos casos necessários, sob a responsabilidade do investigador ou médico que assina este documento, declara estar ciente após ter lido ou ouvido o presente Termo de Consentimento que lhe informa o seguinte:

Que está fazendo um procedimento de diagnóstico laboratorial, recomendado pelo Ministério da Saúde (MS), para diagnosticar parasitologicamente a Leishmaniose Tegumentar Americana (Ferida “braba” ou “Leshe”) e que encontram-se dentro das especificações deste Ministério; (MS, 2000).

Que o presente estudo destina-se a avaliar e melhorar o diagnóstico laboratorial podendo auxiliar, o critério médico de cura;

Que a participação neste estudo é voluntária, assim como a sua recusa não haverá qualquer tipo de retaliação ou perda de benefícios a que o responsável ou seu dependente tenham direito;

Que, havendo concordância na participação no estudo, se procederá às condutas:

1 - Preenchimento da ficha individual (constando de dados relativos à doença);

2 - Que com o consentimento do paciente ou seu responsável, permitam ser coletados de sua(s) lesões, com material(is) descartável(is), para realização de cultura e testes moleculares: Anticorpo monoclonal e Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), com a finalidade de caracterizar espécies e/ou antígenos de *Leishmania sp* no meu organismo, e posterior tratamento. A retirada deste material implica em dor pela picada da agulha no momento da coleta;

3 - Para confirmação do diagnóstico se procederá a coleta de exames com os procedimentos recomendados pelo Ministério da Saúde (MS, Brasil, 2000) através de escarificação e aspirado das lesões cutânea para:

3.1 - Pesquisa direta de *Leishmania* e Histopatologia das lesões;

3.2 - Isolamento do parasito em meios de cultura;

3.3 - Após o tratamento, serão feitas avaliações sorológicas e de bioquímica, periódicas (no início e em cada 21 dias) para controle de cura

IV. Que, participando do estudo, o paciente ou a família não obterão quaisquer benefícios, adicionais além dos já citados (diagnóstico da infecção e/ou doença), que entretanto estarão contribuindo para o conhecimento da eficácia do medicamento em portadores de leishmaniose na pele, podendo desta forma beneficiar outros indivíduos

V. Que a biópsia e ou aspirado é um procedimento utilizado de rotina no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar que implica em dor local, apenas para aplicação de anestesia e posterior retirada de fragmento de pele com material esterilizado, obedecendo todas as normas de segurança e assepsia e que poderá ocorrer sangramento em pequena quantidade. A realização da biópsia de pele será feita apenas por médicos ou acadêmicos de medicina sob supervisão dos médicos participantes do referido projeto.

VI. Que o material retirado do paciente (sangue ou fragmento de pele ou exudato) por biópsia e ou aspirado se destina apenas a pesquisa constante do protocolo. E que concorda que o material excedente (sangue, soro ou tecido), ficará guardado na FMTAM (Gerência de

- Leishmaniose) sob a responsabilidade da instituição e do pesquisador que me assiste, podendo ser utilizado para novas pesquisas envolvendo a doença da qual sou portador.
- VII. Que o projeto poderá ser encerrado caso ocorram efeitos adversos além dos esperados e que possam prejudicar o sujeito da pesquisa.
- VIII. Que a participação neste estudo será confidencial e os registros ou resultados dos testes relacionados ao estudo serão mostrados apenas aos participantes e aos representantes da FMTAM, bem como a autoridades normativas estaduais ou nacionais, com o objetivo de garantir informações de pesquisas clínicas ou para fins normativos. A identidade dos participantes permanecerá sempre em confiabilidade.
- IX. Que o participante e seus familiares têm direitos aos esclarecimentos que julgarem necessários a qualquer período do desenvolvimento deste estudo e será notificado sobre qualquer nova informação relacionada. O Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra, a Dra. Leíla IARC Coelho no laboratório da GELEISH, cujos números de telefone são 92-9988-3215 (Dr. Jorge) e 92-8139-6709 (Leíla), os quais terão disponibilidade para atender e esclarecer possíveis dúvidas dos participantes;
- X. Que o participante tem o direito de se retirar deste estudo a qualquer momento, sem qualquer retaliação, e também o direito de manter cópia assinada deste documento;
- XI. Que, por estar devidamente esclarecido sobre o conteúdo deste termo, livremente expressa consentimento e/ou do seu responsável para participar nesta pesquisa.
- XII. Que os resultados do estudo serão apresentados em órgãos de divulgação pública como congressos e eventos científicos.
- XIII. Que participando do estudo estará contribuindo para, se possível, corrigir sua seqüela e, com certeza colaborarão para minorar problemas semelhantes,
- XIV. As amostras de aspirado e/ou peças de biópsias, após os exames ficarem depositadas na FMTAM (Gerência de Leishmaniose e Sub-Gerência de Anátomo-Patologia), podendo o paciente requerê-las quando julgar necessário.
- XV. Que o sujeito da pesquisa terá direito a ressarcimento de gastos, assistência médica e/ou dos recursos disponíveis na Instituição, onde será realizada a pesquisa, em caso de necessidade, e prejuízo relacionados aos procedimentos realizados em virtude da mesma.
- XVI. Serão excluídas do estudo pessoas grávidas, e/ou que apresentem quaisquer efeitos considerados nocivos, de efeito esperado ou não. Ou ainda outros comprometimentos e/ou doença(s) associada(s) que possa comprometer o sujeito ou os resultados da pesquisa, quer seja antes ou no decorrer da mesma.

Data: .../.../...

...

Nome

...

Idade

...

sexo

Assinatura do paciente ou responsável:

Nome do médico: ...

Assinatura do médico:



Impressão dactiloscópica (p/

analfabeto)

APÊNDICE B – TABELA DE FREQUÊNCIA DA DISTRIBUIÇÃO DE ISOLADOS DE *Leishmania spp*

Distribuição do perfil de isolados de *Leishmania spp.* do estudo e de cepas de referencia da OMS nas infecções mistas

ESPÉCIES DE REFERÊNCIAS/ ISOLADOS	ELETROMORFO (ENZIMA)							SEROD EMAS	ESPÉCIES
	G6PDH	6PDGH	IDH	GPI	PGM	ACON	MPI		
IFLA/BR/1968/PH8	1,0	1,0	1,5	0,5	2,0	1,5	-	M 3,7,8, P9	<i>L.(L.) amazonensis</i>
MHOM/BR/1975/M2903	1,4	1,3	1,3	1,4	1,4	1,3	1,2	D 3,B12,1 6,18	<i>L.(V.) braziliensis</i>
MHOM/BR/1975 / M4147	1,5	2,2	2,0	1,8	1,8	1,9	0,6	B 19,4,5,7 ,11	<i>L.(V.) guyanensis</i>
MHOM/BR/1986 /M5533	2,0	3,0	1,0	2,0	2,0	1,7	-	B1	<i>L.(V.) naiffii</i>
MHOM/BR/FMTAM06	2,20	1,80	1,80	1,50	2,00	1,90	0,00	B5,7,11/ M3,7,8, P9/B1	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.) amazonensis / L.(V.) naiffii</i>
MHOM/BR/FMTAM019	2,20	1,80	1,80	1,50	2,00	1,90	0,00	B12,16, 18/B5/M 3,7,8P9	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)brazilie nsis/ L.(L.)amazon ensis</i>
MHOM/BR/FMTAM020	1,30	1,40	1,80	1,40	1,30	1,90	0,00	B18/B5	<i>L(v.)guyanen sis/ L.(V.)brazilien sis</i>
MHOM/BR/FMTAM052	1,30	1,80	1,40	1,40	2,00	1,90	0,00	D3,B12/ B19,5,7/ M3,P9/ B1	<i>L.(V.)brazilien sis/ L.(V.)guyanen sis/ L.(L.)amazon ensis/ L.(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/FMTAM071	1,30		1,40	1,40	1,30		0,00	B12,18/ B5,7,11/ M3,7,8, P9/B1	<i>L.(V.)guyanen sis/ L.(L.)amazon ensis</i>
MHOM/BR/FMTAM080	1,30		1,40	1,40			0,00	D3,B16/ B19,4,5, 7,11/M3 M7M8,P 9/ B1	<i>L.(V.)brazilien sis /L.(V.)guyane nsis/ L.(L.)amazon ensis</i>
MHOM/BR/FMTAM098	1,30	1,40					0,00	B12,16/ B4,7,11	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)brazilie nsis</i>

CONTINUAÇÃO

MHOM/BR/ FMTAM128	2,20	1,80			2,00		0,00	B16,18/ B5,7/B1	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)brazilien sis/ L.(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/ /FMTAM138	2,20	1,80			2,00		0,00	B16/B5	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)brazilien sis</i>
MHOM/BR/ FMTAM140	2,20	1,80			2,00		0,00	B19/B1	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/ FMTAM141	2,20	1,80			2,00		0,00	B12/B1	<i>L.(V.)brazilie nsis/ L.(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/ /FMTAM145	2,20	1,80			2,00		0,00	B11/B1	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/ FMTAM153	2,20	1,80			2,00		0,00	D3/B19	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)brazilie nsis</i>
MHOM/BR/ FMTAM154	2,20	1,80	1,4 0	1,4 0	1,30		0,00	D3,B12/ B19,5,7	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)brazilie nsis</i>
MHOM/BR/ FMTAM157	2,20	1,40	1,4 0	1,4 0	1,30		0,00	D3,B16, 18/B19, 4,5	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)brazilie nsis</i>
MHOM/BR/ /FMTAM159	2,20	1,80			1,30		0,00	B7,11/B 1	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/ FMTAM163	1,00	2,00			1,50		0,00	B16/B1	<i>L.(V.)brazilie nsis/ L.(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/ FMTAM164	2,20	1,80			1,30		0,00	B11/B1	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/ /FMTAM165	2,20	1,80			1,30		0,00	B11/B1	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/ FMTAM166	2,20	1,80			1,30		0,00	B11/B1	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/ FMTAM167	2,20	1,80			1,30		0,00	B11/B1	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/ /FMTAM168	2,20	1,80			1,30		0,00	D3,B16/ B19,5,7	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)brazilie nsis</i>
MHOM/BR/ FMTAM173	2,20	1,80			1,30		0,00	D3/M3,7 ,8	<i>L.(V.)brazilie nsis/ L.(L.)amazon ensis</i>

CONCLUSÃO

MHOM/BR/ FMTAM176	2,20	1,80			1,30		0,00	B12/B11	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)brazilie nsis</i>
MHOM/BR	2,20	1,80			1,30		0,00	B7,11/M 3,P9/ B1	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)naiffi/ L.(L.)amazon ensis</i>
MHOM/BR/ FMTAM183	2,20	1,80	1,4 0	1,4 0	1,30		0,00	D3/B4,5	<i>L.(V.)guyane nsis/ L.(V.)brazilie nsis</i>

APÊNDICE C – TABELA DE FREQUÊNCIA DE IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE REFERENCIA E DOS ISOLADOS COM OS ELETROMORFOS OBTIDOS POR MLEE E OS SERODEMAS PRO IFI

Lista de identificação das espécies de referencia e dos isolados com os Eletromorfos obtidos por MLEE e os serodemas pro IFI

ESPÉCIES DE REFERENCIAS/ ISOLADOS	6PD GH	PG M	GPI	G6P DH	IDH NA DP	AC ON	M PI	SERODEMAS	ESPÉCIE IDENTIFICADA
IFLA/BR/1968 /PH8	1,0	1,0	1,5	0,5	2,0	1,5	-	M 3,7,8,P9	<i>L.(L.) amazonensis</i>
MHOM/BR/1975 /M2903	1,4	1,3	1,3	1,4	1,4	1,3	1, 2	D 3,B12,16,18	<i>L.(V.) braziliensis</i>
MHOM/BR/1975 /M4147	1,5	2,2	2,0	1,8	1,8	1,9	0, 6	B 19,4,5,7,11	<i>L.(V.) guyanensis</i>
MHOM/BR/1986 /M5533	2,0	3,0	1,0	2,0	2,0	1,7	-	B1	<i>L.(V.) naiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M001	1	1,4	0,5	1	1,5	1,5	1. 2	M7,8,P9	<i>L.(L.)amazonensis</i>
MHOM/BR/FMTA M002	2,2	1,8	1,8	1,4	2	1,9	0	B5,7,11	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M003	1,3	1,4	1,4	1,5	1,3	1,3	0	B12,16/B19,4,5, 7/ M7,8/B1	<i>L.(V.)braziliensis/</i>
MHOM/BR/FMTA M004	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B,7/M8	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M005	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B5,7/M7,P9/B1	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M006	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B5,7,11/ M3,7,8,P9/B1	<i>L.(V.)guyanaensis/ L.(L.)amazonensis/L(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M007	1,3	1,4	1,8	1,4	1,3	1,3	0	B7,11/M3,7,8,P9 /B1	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M008	1	2	1,8	1	1,5	1,5	0	B5,11/ M3M7M8,P9/B1	<i>L.(V.)guyanaensis/ L(V.)amazonensis/L(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M009	2,2		1,8	1,5	2	1,9	0	B19	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M010	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B5,7	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M011	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B19/B1	<i>L.(V.)guyanaensis</i>

CONTINUAÇÃO

MHOM/BR/FMTA M012	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B19,5,11	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M013	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B19,4/M3,8.P9	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M014	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B5/M3,7/B1	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M015	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B19,5,7	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M016	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B5/M3,8	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M017	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B19	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M018	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B16/B19,4/M3,7,8/B1	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M019	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B12,16,18/B5/M3,7,8P9	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M020	1,3	1,4	1,8	1,4	1,3	1,9	0	B18/B5	<i>L(v.)guyanensis/L(V.)braziliensis</i>
MHOM/BR/FMTA M021	1,3	1,4	1,8	1,4	1,3	1,9	0	M3,7,8,P9/B1	<i>L(V.)amazonensis/L(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M022	1,3	1,4	1,8	1,4	1,3	1,9	0	M3,8,P9/B1	<i>L(V.)amazonensis/L(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M023	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B19,5,7	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M024	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B19,4,5	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M025	2,2	1,8	1,8	1,5	2		0	B4,5,7	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M026	1,3	1,4	1,8	1,4	1,3		0	B19,5,7	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M027	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B19	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M028	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B4,5,7	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M029	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B4,5,7	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M030	1,3	1,4	1,4	1,4	1,3	1,3	0	B19	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M031	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B5,7,11/B1	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M032	1,3	1,4	1,4	1,4	1,3	1,3	0	B19,4,5	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M033	1,3	1,4	1,4	1,4	1,3	1,3	0	B4,5,7	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M034	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B19	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M035	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B4,7,11	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M036	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B4	<i>L.(V.)guyanaensis</i>

CONTINUAÇÃO

MHOM/BR/FMTA M037	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B19	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M038								D3/M3,7,8,P9	<i>L.(V.)brazili ensis/L.(L.) amazonen sis</i>
MHOM/BR/FMTA M039	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B5	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M040	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B4,5,7	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M041	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B5,7	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M042	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B5,7/M8,P9/B1	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M043	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B19	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M044	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B5,7,11	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M045	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B5	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M046	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B4,5,7	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M047	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B5	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M048	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B5/P9/B1	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M049	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B5,7	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M050	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B11,19	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M051	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	B19	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M052	1,3	1,8	1,4	1,4	2	1,9	0	D3,B12/B19,5,7/ M3,P9/B1	<i>L(V.)brazili ensis/L(V.) guyanensi s/L(L.)ama zonensis/L (V.)naiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M053	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	D3,B12,18/B4/ M3,P9/B1	<i>L(V.)brazili ensis/L(V.) guyanensi s/L(L.)ama zonensis/L (V.)naiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M054	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	D3,B12,18/ B19,4,5,7,11 /M3,7,8,P9/B1	<i>L.(V.)guya nensis/L(V)brazilien sis/L(L.)a mazonens is/L(V.)naif fii</i>
MHOM/BR/FMTA M055	2,2	1,8	1,8	1,5	2	1,9	0	D3/B19,4,5	<i>L.(V.)guya nensis/L(V)brazilien sis</i>
MHOM/BR/FMTA			2	2	1	1,7	0	B12,16/B19,4,5,	<i>L(V.)brazili</i>

CONTINUAÇÃO

M056								7/ M3,7,P9/B1	<i>ensis/L(V.) guyanensi s/L(L.)ama zonensis/L (V.)naiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M057	1,3	1,4	1,4	1,4	1,3		0	D3,B12,16.18 /B19,4,5,7,11,P9 /B1	<i>L(V.)brazili ensis/L(V .)guyanen sis/L(L.)a mazonens is/L(V.)naif fii</i>
MHOM/BR/FMTA M058	2,2	1,8	1,8	1,5	2		0	B12/B5	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M059	1,3		1,4	1,4	1,3		0	B19	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M060	1,3		1,4	1,4	1,3		0	B12/B1	<i>L(V.)brazili ensis/L(V.) naiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M061	1,3		1,4	1,4	1,3		0	D3,B12	<i>L(V.)brazili ensis</i>
MHOM/BR/FMTA M062	1	2	0,5	1	1,5		0	D3,B12	<i>L(V.)brazili ensis/L(V.) guyanensi s/L(V.)naif fii</i>
MHOM/BR/FMTA M063	2,2	1,8	1,8	1,5	2		0	B12/B19,5/M8,P 9	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M064	2,2	1,8	1,8	1,5	2		0	B12,18/B5	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M065	2,2	1,8	1,8	1,5	2		0	B12,16,18/B5,7/ B1	<i>L.(V.)guya nensis/L(V .)naiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M066	1,3		1,8	1,5	1,3		0	B7/B1	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M067	2,2	1,8	1,8	1,5	2		0	B16/B19,5	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M068	2,2	1,8	1,8	1,5	2		0	B12,16,18/B5,7/ M8,P9/B1	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M069	2,2	1,8	1,8	1,5	2		0	B12,18/B5,7,11/ M3,7,8,P9/B1	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M070	2,2	1,8	1,8	1,5	2		0	B12,18/B5,7,11/ M3,7,8,P9/B1	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M071	1,3		1,4	1,4	1,3		0	B12,18/B5,7,11/ M3,7,8,P9/B1	<i>L(V.)guya nensis/L(L .)amazone nsis</i>
MHOM/BR/FMTA M072	1,3		1,4	1,4	1,3		0	B19,5,11/M8	<i>L(V.)brazili ensis/L(V.) guyanensi s/L(L.)ama zonensis/L (V.)naiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M073	1,3		1,4	1,4	1,3		0	B12,16,18	<i>L(V.)brazili ensis</i>
MHOM/BR/FMTA	1,3		1,4	1,4	1,3		0	B16	<i>L(V.)brazili</i>

CONTINUAÇÃO

M074									<i>ensis/L(V.)guyanensis/L(L.)amazonensis/L(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M075	1,3		1,4	1,4	1,3		0	B19	<i>L(V.)guyanensis</i>
MHOM/BR/FMTA M076	2,2	1,8	1,8	1,5			0	B12,18/B19,4,5,7,11/M3,7,8,P9	<i>L(V.)guyanensis</i>
MHOM/BR/FMTA M077	1,3		1,4	1,4			0	B12,16,18/B19,4,5,7,11/M3,7,8,P9/B1	<i>L(V.)braziliensis/L(V.)guyanensis/L(L.)amazonensis/L(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M078	2,2	1,8	1,8	1,5			0	B12,18/B19,4,5,7,11/M3,7,8,P9/B1	<i>L(V.)guyanensis</i>
MHOM/BR/FMTA M079	2,2	1,8	1,8	1,5			0	B12,16,18/B19,4,5,7,11/M3,7,8,P9/B1	<i>L(V.)guyanensis</i>
MHOM/BR/FMTA M080	1,3		1,4	1,4			0	D3,B16/B19,4,5,7,11/M3M7M8,P9/B1	<i>L(V.)braziliensis/L(V.)guyanensis/L(L.)amazonensis</i>
MHOM/BR/FMTA M081	1,3		1,4	1,4			0	B16/B7/M3,8	<i>L(V.)braziliensis/L(V.)guyanensis/L(L.)amazonensis/L(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M082	2,2	1,8	1,8	1,5			0	B16/B19,5,7,11/M3,7,8,P9/B1	<i>L(V.)guyanensis</i>
MHOM/BR/FMTA M083	2,2	1,8	1,8	1,5			0	B12,16,18/B19,4,5,7,11/M3,7,8,P9/B1	<i>L(V.)guyanensis</i>
MHOM/BR/FMTA M084	2,2	1,8	1,8	1,5			0	B18/B19,7,11/M7,8,P9/B1	<i>L(V.)guyanensis</i>
MHOM/BR/FMTA M085	2,2	1,8	1,8				0	B12,16/B7,11/M7,P9/B1	<i>L(V.)guyanensis</i>
MHOM/BR/FMTA M086	2,2	1,8	1,8				0	B16,18/B4,7,11/M3,7,8,	<i>L(V.)guyanensis</i>
MHOM/BR/FMTA M087	2,2	1,8	1,8				0	B12,16,18/B19,4,5,7/M3,7,8,P9/B1	<i>L(V.)guyanensis</i>
MHOM/BR/FMTA M088	1	2	0,5				0	B12,16,18/B19,4,5,7/M3,7,8,P9/B1	<i>L(V.)braziliensis/L(V.)guya</i>

CONTINUAÇÃO

									<i>nensis/ L.(L.)amaz onensis/ L.(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M089	2,2	1,8					0	B12/B5,7/ M7,8,P9/B1	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M090	2,2	1,8					0	B5,7	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M091	2,2	1,8					0	B12,16,18/B19,4 ,5,7 /M3,7,8/B1	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M092	2,2	1,8					0	B12,16/ B19,5,7/M7	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M093	2,2	1,8					0	B12,16,18/ B19,7/M7,P9	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M094	2,2	1,8					0	B12,16,18/ B19,7/M7,P9	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M095	2,2	1,8					0	B19	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M096	2,2	1,8					0	B18/B7/M7	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M097	2,2	1,8					0	B12/B5	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M098	1,3	1,4					0	B12,16/B4,7,11	<i>L.(V.)brazi liensis/ L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M099	1,3	1,4					0	B12,16/ B19,4,5,7,11/M3 ,7/B1	
MHOM/BR/FMTA M100	2,2	1,8					0	B5	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M101	2,2	1,8					0	B4,5,7	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M102	1	2				1,5	0	B12,16/B7/M7	
MHOM/BR/FMTA M103	2,2	1,8				2	0	B4,5,7	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M104	2,2	1,8				2	0	B19,4,5	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M105	1,3	1,4				2	0	B4,5,7	
MHOM/BR/FMTA M106	2,2	1,8				2	0	B19,4,11	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M107	2,2	1,8				2	0	D3,B12,1/ B4,5,7,11/M3,7, 8,P9	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M108		1,8	0,8			1	0	B4,7,11	<i>L.(V.)guy anensis</i>
MHOM/BR/FMTA M109	1	2				1,5	0	B19	<i>L.(V.)guy anensis</i>
MHOM/BR/FMTA M110	1,3	1,4				1,3	0	B19	<i>L.(V.)guy anensis</i>
MHOM/BR/FMTA M111			0,8			1	0	B19	<i>L.(V.)guy anensis</i>

CONTINUAÇÃO

MHOM/BR/FMTA M112	2,2	1,8			2		0	B12/B7	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M113	1	2			1,5		0	B12,18/ B4,5/P9/B1	<i>L.(V.)guy anensis/L.(V.)brazillie nsis/L.(L.) amazonen sis/L.(V.)n aiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M114	2,2	1,8			2		0	B18/B5/M3	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M115	2,2	1,8			2		0	B5/M3	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M116	2,2	1,8			2		0	B4,7,11	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M117	2,2	1,8			2		0	B19,4,5,7/M7	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M118	2,2	1,8			2		0	B19,4,5	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M119	2,2	1,8			2		0	B19	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M120	2,2	1,8			2		0	B11,7	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M121	2,2	1,8			2		0	B16,18/ B19/M7,8	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M122	2,2	1,8			2		0	D3,B12,16 /B19,5,7/P9	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M123	2,2	1,8			2		0	B19,5,7/P9/B1	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M124	1	2			1,5		0	B19,5	<i>L.(V.)guy anensis</i>
MHOM/BR/FMTA M125	2,2	1,8			2		0	D3/B19	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M126	2,2	1,8			2		0	B12,16/ B5,7,11/M3,7,P9	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M127	2,2	1,8			2		0	B12,16 /B19,4,5/M3,7,8, P9	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M128	2,2	1,8			2		0	B16,18/ B5,7/M3/B1	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M129	2,2	1,8			2		0	B19,7,11	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M130	2,2	1,8			2		0	B4,5,7	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M131	2,2	1,8			2		0	B19,4,5	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M132	2,2	1,8			2		0	B18/B19/M3	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M133	2,2	1,8			2		0	B19	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M134	2,2	1,8			2		0	B4,5,7	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M135	2,2	1,8			2		0	B19	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M136	2,2	1,8			2		0	B5	<i>L.(V.)guya nensis</i>

CONTINUAÇÃO

MHOM/BR/FMTA M137	2,2	1,8			2		0	B5	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M138	2,2	1,8			2		0	B16/B5/M8/B1	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M139	2,2	1,8			2		0	B7	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M140	2,2	1,8			2		0	B19/P9/B1	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M141	2,2	1,8			2		0	B12/B11/B1	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M142	2,2	1,8			2		0	B4	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M143	2,2	1,8			2		0	B11	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M144	1,3	1,4			2		0	B11	<i>L.(V.)guy anensis</i>
MHOM/BR/FMTA M145	2,2	1,8			2		0	B11/B1	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M146	2,2	1,8			2		0	B19,4	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M147	1,3	1,4			1,3		0	B12	<i>L.(V.)brazi liensis</i>
MHOM/BR/FMTA M148	1	2			1,5		0	D3,B16/B5/M3	<i>L.(V.)brazi liensis/ L.(V.)guya nensis /L.(L.)amaz onensis</i>
MHOM/BR/FMTA M149	2,2	1,8			2		0	B19,5	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M150	2,2	1,8			2		0	B5,7	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M151	2,2	1,8			2		0	B4,5,7,11	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M152	2,2	1,8			2		0	B19	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M153	2,2	1,8			2		0	D3,B19	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M154	1	2			1,5		0		<i>L.(V.)brazi liensis</i>
MHOM/BR/FMTA M155	2,2	1,8			2		0	B19	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M156	2,2	1,8			2		0	B5,7,11	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M157	1,3	1,4			1,3		0	B12,16	<i>L.(V.)brazi liensis</i>
MHOM/BR/FMTA M158	2,2	1,8			2		0	B7,11/B1	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M159	2,2	1,8			2		0	B18/B7/M8	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M160	2,2	1,8			2		0	D3/B5	<i>L.(V.)guya nensis</i>
MHOM/BR/FMTA M161	1,3	1,4			1,3		0	D3,B12,16	<i>L.(V.)brazili ensis</i>
MHOM/BR/FMTA M162	2,2	1,8			2		0	B19	<i>L.(V.)guya nensis</i>

CONTINUAÇÃO

MHOM/BR/FMTA M163	1	2			1,5		0	B16/B5,11/B1	<i>L.(V.)braziliensis/L.(V.)guyanensis/L.(V.)naiffi</i>
MHOM/BR/FMTA M164	2,2	1,8			2		0	B11/B1	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M165	2,2	1,8			2		0	B11	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M166	2,2	1,8			2		0	B11	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M167	2,2	1,8			2		0	B19,5,7/ M7P9/B1	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M168	2,2	1,8			2		0	D3,B16/ B19,5,7/P9	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M169	2,2	1,8			2		0	B19	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M170	2,2	1,8			2		0	B7	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M171	2,2	1,8			2		0	B4,5	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M172	2,2	1,8			2		0	B5,7	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M173	2,2	1,8			2		0	D3/B4,5	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M174	2,2	1,8			2		0	B19	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M175	1,3	1,4			2		0	B19,7,11/ M8,P9	<i>L.(V.)braziliensis/L.(V.)amazoneensis</i>
MHOM/BR/FMTA M176	2,2	1,8			2		0	B12/B11/ M7,P9	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M177	2,2	1,8			2		0	B7/M7,8	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M178	2,2	1,8			2		0	B5,7	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M179	2,2	1,8			2		0	B7,11/ M3,7,8,P9/B1	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M180	2,2	1,8			2		0	B7,11 /M3,7,8,P9/B1	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M181	2,2	1,8			2		0	B19	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M182	2,2	1,8			2		0	B7,11	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M183	2,2	1,8			2		0	D3/B4,5	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M184	2,2	1,8			2		0	B19	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M185	2,2	1,8			2		0	B7	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M186	2,2	1,8			2		0	B4	<i>L.(V.)guyanaensis</i>

CONTINUAÇÃO

MHOM/BR/FMTA M187	2,2	1,8			2		0	B7/M3,P9	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M188	2,2	1,8			2		0	B7	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M189	1,3	1,8			1,3		0	B19	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M190	2,2	1,8			2		0	B7/P9/B1	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M191	2,2	1,8			2		0	B5,7	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M192	1,3	1,4			2		0	B7	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M193	2,2	1,8			2		0	B19	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M194	2,2	1,8			2		0	B12/B5/M3,P9	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M195	2,2	1,8			2		0	B19	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M196	1	2			1,5		0	B12	<i>L.(V.)BRAZILIENSIS</i>
MHOM/BR/FMTA M197	2,2	1,8			2		0	D3/B4,5	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M198	2,2	1,8			2		0	B19	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M199	2,2	1,8			2		0	B12/B11/M3	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M200	2,2	1,8			2		0	B7,11	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M201	2,2	1,8			2		0	B19	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M202	2,2	1,8			2		0	B4,5,7	<i>L.(V.)guyanaensis</i>
MHOM/BR/FMTA M203	1,3	1,4	0,8		1		0	B12	<i>L.(V.)braziliensis</i>
MHOM/BR/FMTA M204	1,3	1,4						B12,18/P9	<i>L.(V.)braziliensis/L(V.)naiffii</i>
MHOM/BR/FMTA M205	1,3	1,4						B12,18/P9	<i>L.(V.)braziliensis</i>
MHOM/BR/FMTA M206	1,3	1,4						B12,16	<i>L.(V.)braziliensis</i>
MHOM/BR/FMTA M207	1,3	1,4						D3,B16,18	<i>L.(V.)braziliensis</i>
MHOM/BR/FMTA M208	1,3	1,4						D3,B12	<i>L.(V.)braziliensis</i>

CONCLUSÃO

**APÊNDICE D - Artigo submetido em 28/05/2010 e aceito para publicação em
30/09/2010**