



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Pesquisa Clínica Evandro Chagas
Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

CÍNTIA CRISTIANE DE PAULA

**INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE *Leishmania* EM LESÕES
CUTÂNEAS CICATRIZADAS E PELE SADIA DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA CLINICAMENTE
CURADOS**

RIO DE JANEIRO
2010

DISSERTAÇÃO DPCDI – IPEC C.C. DE PAULA 2010

INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE *Leishmania* EM LESÕES
CUTÂNEAS CICATRIZADAS E PELE SADIA DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA CLINICAMENTE
CURADOS

CÍNTIA CRISTIANE DE PAULA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para a obtenção de grau de Mestre em Ciências.

Orientado por Prof. Dr. Armando de Oliveira Schubach e Prof. Dr. Aline Fagundes da Silva.

RIO DE JANEIRO
2010

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P281

Paula, Cíntia Cristiane de.

Investigação da presença de *Leishmania* em lesões cutâneas cicatrizadas e pele sadia de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana clinicamente curados. / Cíntia Cristiane de Paula. – Rio de Janeiro, 2010.

x, 68 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2010.

Bibliografia: f. 49-56

1. Leishmaniose. 2. Leishmaniose Tegumentar Americana. 3. Reação em cadeia da Polimerase. 4. Cicatriz. 5. Persistência parasitária.
I. Título.

CDD 616.9364

CÍNTIA CRISTIANE DE PAULA

INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE *Leishmania* EM LESÕES
CUTÂNEAS CICATRIZADAS E PELE SADIA DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA CLINICAMENTE
CURADOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para a obtenção de grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Prof. Dr. Armando de Oliveira Schubach

Prof. Dr. Aline Fagundes da Silva

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raquel da Silva Pacheco (Presidente)

Doutor em Biologia Celular e Molecular

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz

Prof. Dr. Maria de Fátima Madeira (Componente)

Doutor em Ciências

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz

Prof. Dr. Eliame Mouta Confort (Componente)

Doutor em Ciências

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz

A DEUS, pela inspiração e luz.

*Aos meus Pais e Avós, por tudo que me ensinaram,
pelas palavras sábias e por toda a educação que
recebi.*

Aos meus irmãos, pelo apoio em todos os momentos.

*Ao meu marido, por ser meu companheiro nas alegrias
e tristezas, pelo carinho, incentivo, paciência,
dedicação e apoio...*

Aos meus amigos, pela ajuda e compreensão.

AMO MUITO VOCÊS....

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, por todas as oportunidades que tive em minha vida e por abrir meus caminhos, me ajudando a vencer todos os obstáculos e fortalecendo-me a cada momento.

À toda minha família, em especial meus pais **José Afonso de Paula** e **Maria Nilda de Paula**, meus avós **Paulo Moreira de Oliveira** e **Geraldina Maria de Oliveira** e meus irmãos **Cimeri Cristina de Paula** e **Claudinei de Paula**. Pessoas que amo muito e que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas.

Ao meu companheiro, amigo e marido **Alírio Gomes da Silva Júnior**, por todo carinho, confiança, amor, dedicação, suporte e paciência durante toda minha trajetória e por ser essa pessoa tão especial a quem eu amo muito.

Ao *Toxoplasma gondii* que ao me infectar me proporcionou uma vida nova, me fazendo ter certeza de que DEUS escreve certo por linhas tortas.

Aos meus anjos da guarda, minhas grandes amigas, **Isabel Cristina Fábregas Bonna**, **Elizabeth de Souza Neves**, **Aline Fagundes da Silva** e **Maria de Fátima Madeira** que confiaram em mim e me fizeram chegar até aqui.

À **Priscilla Germano Maia** e **Wendy Fernandes Bueno**, amigas com quem dividi alegrias e tristezas durante um período de tantas adaptações e mudanças.

À minha querida **Elizete Gouveia “Suzana”**, por todo cuidado e dedicação que teve comigo.

Aos meus orientadores **Dr. Armando Schubach** e **Dra. Aline Fagundes**, por seus sábios ensinamentos e pela constante orientação na minha vida profissional.

A todos os colegas do **Laboratório de Vigilância em Leishmanioses/IPEC-FIOCRUZ**, que me ajudaram a vencer mais este obstáculo. Em especial a “**minha sócia**” **Tatiana Cristina Vieira de Carvalho** e a **Cibele Baptista** pela ajuda durante todos estes anos, onde formamos uma grande amizade.

À toda “**Equipe PCR**”, onde tudo começou, com muita alegria.

Aos **pacientes** envolvidos, que através de uma atitude voluntaria nos permitiu a realização deste trabalho.

Ao **Laboratório de Vigilância em Leishmanioses/IPEC-FIOCRUZ** pela ajuda na realização dos exames de PCR, isolamento, “imprint” e sorologias. E também a toda a equipe responsável pela clínica, biópsia e teste intradérmico.

Ao **Laboratório de Anatomia Patológica/IPEC-FIOCRUZ**, na figura do **Dr. Leonardo Pereira Quintela** pela realização do exame histopatológico.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)** pelo apoio financeiro e bolsas disponibilizados para a realização deste estudo.

A todos que entraram em minha vida e me inspiraram, comoveram e iluminaram com a sua presença e que direta ou indiretamente me ajudaram nas minhas escolhas e realizações.

MUITO OBRIGADA.....

*“Suba o Primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja
toda a escada. Apenas dê o
primeiro passo”*

(Martin Luther King)

*“Você pode sonhar, criar e construir
a idéia mais maravilhosa do
mundo, mas são necessárias
pessoas para fazer o sonho virar
realidade”*

(Walt Disney)

de Paula, C.C. **Investigação da presença de *Leishmania* em lesões cutâneas cicatrizadas e pele sadia de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana clinicamente curados.** Rio de Janeiro, 2010 68 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença endêmica, causada por diferentes espécies de *Leishmania* e distribuída por todos os estados brasileiros. No entanto, não estão estabelecidos os critérios de cura clínica definitiva, nem a participação da resposta imunológica na manutenção do estado de cura, na reativação de lesões e no desenvolvimento da forma mucosa. A persistência parasitária após a cura clínica, já demonstrada anteriormente, poderia estar relacionada a estes fenômenos. Este estudo objetivou identificar DNA de *Leishmania* e a presença de parasitas através do cultivo, do exame direto e do exame histopatológico, em cicatrizes cutâneas e em pele sadia de pacientes com LTA tratados e clinicamente curados. Cinquenta pacientes com LTA e 30 com esporotricose (grupo controle) foram submetidos a avaliação dermatológica, avaliação otorrinolaringológica com fibra óptica, intradermoreação de Montenegro (IDRM), e sorologia para leishmaniose por ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e por reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Após consentimento livre e esclarecido, fragmentos de cicatriz e de pele sadia foram obtidos por biópsia, com o auxílio de “punch” 6mm. O tempo mediano decorrido entre a cicatrização da lesão e entrada no projeto foi de 25 (LTA) e 46 meses (controle) respectivamente. Os fragmentos teciduais, cujo peso mediano foi de 7,1mg, foram subdivididos em pequenas amostras submetidas à: a) extração de DNA e amplificação genérica e subgenérica por reação em cadeia da polimerase (PCR) com revelação em gel de agarose dos produtos amplificados; b) isolamento de formas promastigotas em meio de cultura bifásico (NNN enriquecido com meio Schneider e soro fetal bovino); c) investigação de formas amastigotas por exame direto corado pelo Giemsa; e d) exame histopatológico. Todos os pacientes encontravam-se clinicamente curados, com lesões cutâneas cicatrizadas e sem lesões mucosas em atividade. A IDRM foi positiva em 88% dos pacientes, a sorologia por ELISA em 44% e a RIFI em 26%. Foram encontradas duas amostras de cicatriz cutânea positivas para *Leishmania*, uma na PCR e outra no “imprint”, ambas do grupo de LTA. As demais amostras de cicatriz e de pele sadia foram negativas. Os presentes resultados confirmam achados anteriores que *Leishmania* pode persistir em lesões cicatrizadas. A negatividade para *Leishmania* nas amostras de pele sadia não apóia a hipótese do ser humano como fonte de infecção. A baixa frequência de positividade encontrada nas cicatrizes pode ser parcialmente explicada pela realização das biópsias no bordo da cicatriz, região por onde se inicia o processo de cicatrização durante o tratamento, pelo tamanho diminuto dos fragmentos cutâneos estudados e pela baixa carga parasitária.

Palavras-chave: 1. *Leishmania*. 2. Leishmaniose Tegumentar Americana. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Cicatriz. 5. Persistência Parasitária.

de Paula, C.C. **Investigate on the presence of *Leishmania* in healed skin lesions and healthy skin of patients with clinically cured Cutaneous Leishmaniasis.** Rio de Janeiro, 2010 68 f. Dissertation [Masters Degree in Clinical Research in Infectious Diseases] Institute of Clinical Research Evandro Chagas.

ABSTRACT

American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is an endemic disease caused by different species of *Leishmania* and distributed in all Brazilian states. However, there are neither established criteria for definitive clinical cure, nor on the immune response participation in the maintenance of the state of cure, in the reactivation of the lesions, and in the development of the mucosal form. The parasite persistence after clinical cure, previously demonstrated, could be related to these phenomena. This study aimed to identify *Leishmania* DNA and the presence of parasites through cultivation, direct examination and histopathology studies on skin scars and healthy skin of patients with ACL treated and clinically cured. Fifty patients with ACL and 30 with sporotrichosis (control group) underwent dermatologic assessment, EENT fiber optics evaluation, Montenegro skin test (MST), and leishmaniasis serology by enzyme immunoassay (ELISA) and indirect immunofluorescence assay (IFA). After informed consent, fragments of scarred and healthy skin were obtained by punch 6 mm biopsy. The median time between the healing of the lesion and study entry was 25 (ACL) and 46 months (control) respectively. The tissue samples, whose average weight was 7.1 mg, were further divided into small samples submitted to: a) DNA extraction and generic and subgeneric amplification by polymerase chain reaction (PCR) with in agarose gel revelation of amplified products, b) isolation of promastigotes in biphasic medium (NNN medium enriched with fetal calf serum in Schneider media), c) investigation of amastigotes forms by Giemsa-stained direct examination, and d) histopathological studies. All patients were clinically cured, with healed skin lesions and no mucosal lesions in activity. The MST was positive in 88% of patients, ELISA serology in 44% and IFAT in 26%. Two cutaneous scarring samples were found positive for *Leishmania*, one by PCR and one in the "imprint", both ACL group. Additional samples of scarred and healthy skin were negative. The present results confirm earlier findings that *Leishmania* may persist in healed lesions. The samples negative for *Leishmania* in the healthy skin does not support the hypothesis of human beings as a source of infection. The low frequency of positivity found in the scarred tissues may be partially explained by the performance of biopsies at the edge of the scarred region, where the healing process begins during treatment, and the extremely small size of the skin fragments studied and low parasite load.

Keywords: 1. *Leishmania*. 2. American Cutaneous Leishmaniasis. 3. Polymerase Chain Reaction. 4. Scarred Tissue. 5. Parasite Persistence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Ciclo biológico das leishmanioses (WHO, 2010) | 2 |
| Figura 2 - Distribuição de espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar americana, Brasil – 2005 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). | 7 |
| Esquema 1 - Realização da Biópsia | 20 |
| Esquema 2 - Protocolo de Biologia Molecular (MONTEIRO, 2006) | 29 |
| Figura 3 - Relação entre a quantidade de DNA extraído e o tamanho do fragmento cutâneo processado. | 38 |
| Figura 4 - Amplificação por reação em cadeia da polimerase do kDNA de <i>Leishmania</i> extraído de tecido de cicatriz. “Primers” genérico..... | 39 |
| Figura 5 - Amplificação por reação em cadeia da polimerase do kDNA de <i>Leishmania</i> extraído de tecido de cicatriz. “Primer” subgenérico..... | 39 |

LISTA DE TABELAS E QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 – “Primers” utilizados para a Amplificação do DNA..... | 30 |
| Tabela 1 - Intradermorreação de Montenegro - distribuição de pacientes reatores e não reatores para LTA e esporotricose na época do diagnóstico e na reavaliação, após a cura clínica..... | 34 |
| Tabela 2 - Ensaio imunoenzimático para leishmaniose – distribuição de soros reatores e não reatores para LTA e esporotricose na época do diagnóstico e na reavaliação, após a cura clínica..... | 35 |
| Tabela 3 - Reação de imunofluorescência indireta para leishmaniose - distribuição de soros reatores e não reatores para LTA e esporotricose na época do diagnóstico e na reavaliação, após a cura clínica | 35 |
| Tabela 4 - Reação de imunofluorescência indireta para leishmaniose - distribuição dos títulos de anticorpos encontrados em paciente com leishmaniose tegumentar americana, na época do diagnóstico e na reavaliação, após a cura clínica..... | 35 |
| Tabela 5 - Principais características dos dois pacientes positivos para <i>Leishmania</i> na cicatriz. | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- bp** – Pares de bases
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
DNA – Ácido desoxirribonucléico
dNTPs – di-deoxinucleotídeos Trifosfato
EDTA – (Ethylenediamine tetraacetic acid) Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA – (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Ensaio imunoenzimático indireto
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
g – Grama
HE – Coloração por Hematoxilina-Eosina
IDRM – Intradermorreação de Montenegro
IgG – Imunoglobulina G
IM – Intramuscular
IPEC – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
IV – Intravenosa
kDNA – DNA do cinetoplasto
l – Litro
LC – Leishmaniose Cutânea
LCM – Leishmaniose Cutâneomucosa
LM – Leishmaniose Mucosa
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
LT – Leishmaniose Tegumentar
LV – Leishmaniose Visceral
M – Molar
mg – Miligrama
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
mL – Mililitro
mm – Milímetros
ng – Nanograma
NNN – Meio de cultura de Novy, Nicolle e McNeal
PAS – Coloração por Ácido Periódico de Schiff
PBS – Salina tamponada com fosfatos
PBS-T-L – Salina tamponada com fosfatos, Tween e leite desnatado
PCR – Reação em Cadeira da Polimerase
pH – Potencial Hidrogeniônico
q.s.p – Quantidade suficiente para
RIFI – Reação de imunofluorescência indireta
RPM – Rotações por minuto
TBE – Tampão contendo Tris, Ácido Bórico e EDTA
U – Unidades
µg – Micrograma
µL – Microlitro

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. LEISHMANIOSES | 1 |
| 1.2. CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DA LTA | 4 |
| 1.3. EPIDEMIOLOGIA DA LTA NO BRASIL..... | 5 |
| 1.4. DIAGNÓSTICO DA LTA | 8 |
| 1.5. TERAPÊUTICA DA LTA | 10 |
| 1.6. CRITÉRIO DE CURA CLÍNICA..... | 11 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 13 |
| 3. OBJETIVOS..... | 17 |
| 3.1. GERAL..... | 17 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 17 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 4.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO | 18 |
| 4.2. COLETA DE ESPÉCIMES CLÍNICOS PARA DIAGNÓSTICO..... | 19 |
| 4.3. INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO | 20 |
| 4.4. SOROLOGIA..... | 21 |
| 4.4.1. <i>Ensaio Imunoenzimático</i> | 21 |
| 4.4.2. <i>Reação de Imunofluorescência Indireta</i> | 22 |
| 4.5. ISOLAMENTO EM MEIO DE CULTURA..... | 23 |
| 4.6. “IMPRINT”..... | 24 |
| 4.7. EXAME HISTOPATOLÓGICO | 24 |
| 4.8. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE..... | 25 |
| 4.8.1. <i>Extração de DNA dos fragmentos de biópsia</i> | 25 |
| 4.8.2. <i>Avaliação do DNA extraído por espectrofotometria e gel de agarose</i> | 25 |
| 4.8.3. <i>PCR – Gênero Específico</i> | 26 |
| 4.8.4. <i>PCR – Subgênero Específico</i> | 27 |
| 4.8.5. <i>Revelação do produto amplificado</i> | 27 |
| 4.8.6. <i>Controles da reação de PCR</i> | 28 |
| 4.8.7. <i>Teste de Inibição</i> | 28 |
| 4.9. ANÁLISE DOS RESULTADOS..... | 30 |
| 5. RESULTADOS..... | 32 |
| 5.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO | 32 |
| 5.2. INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO | 33 |
| 5.3. SOROLOGIA..... | 34 |
| 5.4. ISOLAMENTO..... | 36 |
| 5.5. “IMPRINT”..... | 36 |
| 5.6. HISTOPATOLOGIA..... | 36 |
| 5.7. PCR | 37 |
| 5.8. RELATO DE CASOS | 40 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 41 |
| 7. CONCLUSÕES | 47 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |
| ANEXOS..... | 57 |
| ANEXO 1 – APROVAÇÃO NO CEP | 58 |
| ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO | 59 |
| <i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 1</i> | 59 |
| <i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controle Esporotricose 2</i> | 64 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. LEISHMANIOSES

As leishmanioses são antroponozoonoses endêmicas em 88 países situados em regiões tropicais e sub-tropicais e estão entre as seis doenças prioritárias no mundo segundo a Organização Mundial de Saúde. Anualmente, são registrados aproximadamente 1-2 milhões de novos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; WHO, 2010). Entretanto, fatores como a globalização econômica e o aumento de viagens, estenderam o risco de transmissão para pessoas residentes fora de áreas endêmicas (AMATO et al, 2007).

As leishmanioses são causadas por protozoários pertencentes à Ordem Kinetoplastida, da Família Trypanosomatidae (ROSS, 1903) e Gênero *Leishmania*, subdividido em subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1987). O ciclo biológico compreende as formas flageladas (promastigotas), que se desenvolvem no trato alimentar dos flebotomíneos (Ordem Díptera; Subfamília Phlebotominae; Gênero *Lutzomyia*) e que são transmitidas através da picada, durante o repasto sanguíneo das fêmeas do inseto vetor. Ao infectar os hospedeiros vertebrados (mamíferos), as formas promastigotas penetram nas células do sistema fagocítico mononuclear e se modificam em formas arredondadas, sem flagelo livre (amastigotas) que se multiplicam e geram resposta imunológica do hospedeiro com consequente dano celular (Figura 1) (HOARE; WALLACE, 1966; BERMAN; WYLER, 1980; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

denominadas *L. infantum infantum* e *L. infantum chagasi* (LAINSON; RANGEL, 2003; LAINSON; SHAW, 2005; LAINSON; RANGEL, 2005). Portanto, a classificação mais correta ainda continua sendo discutida no campo científico.

As LT ocorrem com grande prevalência na América do Sul, no Norte da África e na Ásia Central e Oriental (WHO, 2010). No Novo Mundo, admite-se que a leishmaniose tegumentar americana (LTA) seja autóctone (GRIMALDI Jr et al, 1989). A LT abrange a forma cutânea localizada, com possibilidade de regressão espontânea; a forma cutânea nodular difusa, de difícil tratamento; e a forma mucosa, que pode cursar lesões destrutivas e mutilantes na face, levando ao estigma social e psicológico (WHO, 2010). A LTA encontra-se distribuída desde o sudeste dos Estados Unidos até o nordeste da Argentina (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). No Brasil concentra-se cerca de 30.000 novos casos anuais (VIEIRA-GONÇALVES et al, 2008; PORTAL DA SAÚDE, 2010). As espécies causadoras da LTA pertencem aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*: *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) garnhami*, *L. (L.) aristidesi*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lansoni* e *L. (V.) lindenbergi*. Além destas espécies, *L. equatoriensis*, *L. (V.) colombiensis* e *L. (L.) venezuelensis* têm sido descritas na América do Sul (GRIMALDI Jr et al, 1992; GRIMALDI Jr; TESH, 1993; CUPOLILLO et al, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

No Brasil, são reconhecidas seis espécies de flebotomíneos transmissores da LTA: *Lutzomyia intermedia*, *L. whitmani*, *L. flaviscutellata*, *L. wellcomei*, *L. umbratilis* e *L. migonei* (GRIMALDI Jr; TESH, 1993; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Acredita-se que a LTA seja uma doença zoonótica e que o ser humano seja um hospedeiro acidental (GRIMALDI Jr; TESH, 1993). Algumas espécies de animais silvestres, como roedores, marsupiais, endentados e canídeos têm sido sugeridas como possíveis reservatórios naturais. Animais domésticos como cães e equinos, podem estar

envolvidos no ciclo de transmissão (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; VIEIRA-GONÇALVES et al, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Os desmatamentos e a ocupação desordenada de áreas florestais têm modificado o perfil epidemiológico da doença, pela adaptação dos parasitas e dos vetores a estas mudanças. A transmissão, anteriormente restrita ao ciclo silvestre, passou a ocorrer nos cenários urbano, periurbano e rural (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; PASSOS et al, 1999; CUPOLILLO et al, 2003; SHAW, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Nesse contexto, é possível que seres humanos participem como fonte de infecção de *L. (V.) braziliensis* em locais com transmissão peridomiciliar ou domiciliar (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

1.2. CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DA LTA

O tipo de lesão mais comum é úlcera cutânea única; arredondada; indolor; com base infiltrada e endurecida; borda bem delimitada, elevada e eritematosa; e fundo granuloso. Eventualmente, múltiplas picadas do inseto ou a disseminação por via hemática podem gerar um número elevado de lesões (LAINSON et al, 1994; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; SILVEIRA et al, 2004; SCHUBACH et al, 2005).

Marzochi; Marzochi (1994) sugeriram a seguinte classificação clínica para a LTA:

1. Leishmaniose cutânea inaparente – Indivíduos sem lesões aparentes e que podem desenvolver doença no caso de imunossupressão; Intradermoreação de Montenegro (IDRM) positiva.
2. Leishmaniose cutânea (LC) – Indivíduos com lesões ulceradas localizadas e IDRM positiva. Indivíduos com lesões ulceradas disseminadas (múltiplas lesões) e IDRM positiva.

Indivíduos com lesões ulceradas difusas (múltiplas lesões papulares e/ou nodulares) e IDRMM negativa.

3. Leishmaniose mucosa (LM) – Indivíduos com lesões nas mucosas das vias aero digestivas superiores associadas à cicatriz de LC anterior e IDRMM positiva. Indivíduos com lesão mucosa, sem cicatriz de LC e IDRMM positiva. Indivíduos com lesão mucosa externa ocasionalmente na região exposta a picada do vetor sem cicatriz de LC e IDRMM positiva.

4. Leishmaniose mucocutânea (LCM) – Indivíduos com lesões cutâneas e mucosas ativas simultaneamente ou de forma contínua; IDRMM positiva.

1.3. EPIDEMIOLOGIA DA LTA NO BRASIL

No Brasil, a LTA está distribuída por todos os Estados (GRIMALDI Jr et al, 1989; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A região Norte apresenta o maior coeficiente de casos, seguida pelas regiões Nordeste e Centro-Oeste (PORTAL DA SAÚDE, 2010). No país, já foram identificadas seis espécies de *Leishmania* pertencentes ao subgênero *Viannia* e uma pertencente ao subgênero *Leishmania*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naifi*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) shawi* e *L. (L.) amazonensis* (Figura 2). As principais espécies encontradas parasitando o homem são:

1. *Leishmania (Viannia) braziliensis* (VIANNA, 1911) – Foi a primeira espécie descrita e incriminada como agente etiológico da LTA. É a espécie mais frequente na América Latina e está distribuída em todo território brasileiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Causa a LC localizada, a LCM e a LM. Pode infectar animais domésticos e silvestres e está associada a

diferentes espécies de flebotomíneos (*Lutzomyia complexa*, *L. wellcomei*, *L. whitmani*, *L. migonei*, *L. neivai* e *L. intermedia*) (MARZOCHI, 1992; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

2. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LAINSON; SHAW, 1972) – Encontrada em alguns Estados das cinco regiões do Brasil, e tem como reservatório roedores do gênero *Oryzomys* e *Proechymis*. Seus principais vetores são *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. reducta* e *L. olmeca nociva*, espécies pouco antropofílicas, o que justifica o baixo número de casos humanos por esta espécie (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Causa lesão cutânea simples, porém, indivíduos com anergia específica a antígenos de *Leishmania* podem desenvolver leishmaniose cutânea difusa, forma grave e pouco responsiva ao tratamento. Casos de visceralização de *L. (L.) amazonensis* foram descritos na Bahia (BARRAL et al, 1991; SHERLOCK, 1996).

3. *Leishmania (Viannia) guyanensis* (FLOCH, 1954) – Restrita a Região Norte do País, em áreas que não alagam no período de chuvas. Foi encontrada parasitando preguiça (*Choloepus didactylus*), tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) e gambá (*Didelphis albiventris*). Seu principal vetor é *Lutzomyia umbratilis* e *L. anduzei*. Pode causar lesões cutâneas, frequentemente múltiplas, devido a numerosas picadas do vetor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).



Figura 2 - Distribuição de espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar americana, Brasil – 2005 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

No Rio de Janeiro, a LTA é uma doença endêmica com características clínicas e epidemiológicas distintas quando comparada a outras regiões do Brasil: baixa carga parasitária, tempo de evolução curto, boa resposta imune e poucos casos com envolvimento da mucosa (VIEIRA-GONÇALVES et al, 2008). Neste estado, a doença é causada por *L. (V.) braziliensis* e transmitida por *Lutzomyia intermedia* (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). Recentemente, foi descrito o primeiro caso autóctone de infecção por *L. (L.) amazonensis* (AZEREDO-COUTINHO et al, 2007).

1.4. DIAGNÓSTICO DA LTA

O diagnóstico clínico deve ser complementado pela história epidemiológica e por métodos laboratoriais (SILVA, 1999). No entanto, o diagnóstico de certeza implica no isolamento de formas promastigotas de *Leishmania* em cultivo *in vitro* ou na visualização de formas amastigotas por pesquisa direta ou por exame histopatológico. Ao se considerar o diagnóstico diferencial com outras doenças como a sífilis, hanseníase, paracoccidiodomicose, sarcoidose, cromoblastomicose, úlceras decorrentes da anemia falciforme, piodermites, tumores, vasculites, tuberculose, esporotricose, etc. a comprovação parasitológica torna-se necessária. Porém estes métodos são pouco sensíveis e dependem de fatores como: número insuficiente de formas amastigotas nos esfregaços e cortes histológicos, crescimento inadequado do parasita em meios de cultura, experiência do profissional, espécie de *Leishmania* envolvida, forma clínica e duração da lesão. Adicionalmente, tais técnicas não permitem a distinção entre reativação e re-infecção de lesões de LTA (SARAVIA et al, 1990; BOTILDE et al, 2006).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste na amplificação, *in vitro*, de regiões do DNA parasitário. O alvo utilizado são as sequências do DNA do cinetoplasto (kDNA) que são mitocôndrias especializadas pertencentes a ordem Kinetoplastida. O kDNA consiste em uma rede de sucessivas moléculas circulares e complexas dividida em duas classes: os minicírculos e os maxicírculos. Os minicírculos apresentam um grande número de pequenos anéis de DNA com cerca de 10.000 cópias/parasito divididos em classes nas quais podem conter sequências de 100-200 pares de bases que são extremamente conservadas entre os diferentes grupos taxonômicos dentro dos tripanosomatídeos, denominada sequência universal – região conservada, enquanto que as regiões restantes variam entre espécies – região variável. Os maxicírculos apresentam vários anéis maiores com 20 a 50 cópias/parasito e estão associados à codificação de proteínas para produção de energia (BREWSTER et al,

1998; RODRIGUEZ et al, 2000; BREWSTER; BARKER, 2002; SIMPSON et al, 2002; SILVA, 2007). A técnica é de difícil execução e alcança percentuais de positividade variáveis (MARZOCHI, 1992; DEGRAVE et al, 1994; PIRMEZ et al, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; FAGUNDES et al, 2010). A PCR tem se mostrado sensível para o diagnóstico de LTA, embora não seja empregada rotineiramente, devido a sua complexidade e alto custo (TAYLOR, 1978; LIVNI et al, 1983; WEIGLE et al, 1987; DEGRAVE et al, 1994; PIRMEZ et al, 1999; SILVA, 2007). O valor da PCR, demonstrado na investigação de casos clínicos que não puderam ser esclarecidos por outros métodos de diagnóstico, sugere que esta técnica possa ser utilizada para estudos de infecção subclínica. Nestes casos, o encontro do DNA parasitário pode ser associado à presença de parasitas viáveis no hospedeiro (SILVA, 2007; FAGUNDES et al, 2010).

Por conta de escassez de recursos nas áreas endêmicas, na prática, o diagnóstico de LTA baseia-se no aspecto clínico, na IDR, na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* e na resposta a terapêutica antimonial (SILVA, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; FAGUNDES et al, 2010).

A IDR é considerada de alto valor preditivo e, quando associada à presença de lesão tegumentar suspeita, é o exame confirmatório mais utilizado no diagnóstico (MARZOCHI, 1992; WEIGLE et al, 1993^a). Alguns fatores devem ser levados em consideração na interpretação da IDR, por exemplo, a permanência da positividade por longo tempo após a infecção e a possibilidade de falsos negativos no primeiro mês de infecção (SILVA, 1999; MOUTA-CONFORT, 2009).

Os exames sorológicos, como reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), são úteis no diagnóstico principalmente das formas mucosas, porque nestes casos os níveis séricos de anticorpos IgG anti-*Leishmania* são mais elevados. Porém, o encontro de falsos negativos e de reações inespecíficas podem limitar o seu uso.

Logo após o tratamento e a cura clínica, os níveis de anticorpos costumam diminuir (SILVA, 1999; MOUTA-CONFORT, 2009).

Desta forma, os métodos imunológicos podem ser insuficientes para diagnosticar com segurança pacientes com LTA ativa ou reativada, além de se mostrarem incapazes de identificar cicatrizes de LTA.

A RIFI deve ser sempre associada a outras técnicas de diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Segundo Mouta-Confort (2009) a sensibilidade do ELISA não diferiu da encontrada para a IDRM e para PCR, sendo superior a todas as técnicas parasitológicas. Este autor observou melhora na especificidade com pouca perda na sensibilidade quando o ELISA foi associado a IDRM. Finalmente, sugeriu que o ELISA poderia ser útil nas seguintes situações: diagnóstico de LTA em pacientes com suspeita clínica e epidemiológica, porém, com outros resultados inconclusivos; controle de cura e indicador de reativação. Adicionalmente, pacientes com esporotricose podem apresentar-se reatores a IDRM e a exames sorológicos para leishmanioses, talvez por reação cruzada. Em alguns casos, é possível que esta reatividade signifique coinfeção subclínica por *Leishmania* (CARVALHO et al, 1987; DE LIMA BARROS et al, 2005; MOUTA-CONFORT, 2009).

1.5. TERAPÊUTICA DA LTA

As drogas de primeira escolha para o tratamento da LTA são os antimoniais pentavalentes, fármacos leishmanicidas que interferem na bioenergética das formas amastigotas da *Leishmania*. No Brasil, o antimoníaco de meglumina (Glucantime[®]), por via intramuscular (IM) ou intravenosa (IV), na dose de 10-20mg Sb⁵⁺/kg/dia por 20 dias, é indicado para o tratamento da LC. Como a LM apresenta respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas, é preconizado que o esquema terapêutico seja realizado por 30 dias (MARSDEN, 1986; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A necessidade de aplicação parenteral e de monitorização de efeitos adversos, além da ausência de um critério de cura definitiva, em áreas de difícil acesso aos serviços de saúde, existe a dificuldade da adesão ao tratamento (PASSOS et al, 2001; RODRIGUES et al, 2006).

1.6. CRITÉRIO DE CURA CLÍNICA

A resposta de pacientes ao tratamento antimonial pode variar em função de fatores como a resistência inerente do protozoário ao fármaco, o estado imunológico do paciente, a forma clínica da doença e a farmacocinética da droga (BERMAN et al, 1982; BERMAN, 1988; OLIVEIRA-NETO et al, 2000; AZEREDO-COUTINHO et al, 2007^b).

Na LC o critério de cura clínico adotado é a cicatrização completa da lesão, com regressão total da infiltração e do eritema até três meses após a conclusão do esquema terapêutico (SCHUBACH, 1990; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Na LM a regressão de todos os sinais deve ser verificada por exame otorrinolaringológico até seis meses após o término do tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Entretanto, o controle de cura clínico é insatisfatório, pois são documentadas recidivas após o tratamento e cicatrização completa da lesão inicial (PASSOS et al, 2001).

A presença de reativação espontânea, o aparecimento da forma mucosa metastásica até vários anos após o tratamento da LC, a transmissão por transplante de órgãos (GOLINO et al, 1992) e casos em pacientes imunodeprimidos (COURA et al, 1987; DA-CRUZ et al, 1992) sugerem a persistência do parasito no ser humano (BOWDRE et al, 1981; MARTINEZ et al, 1992; SCHUBACH et al, 1998^b; SCHUBACH et al, 2005).

Utilizando algumas técnicas laboratoriais, vários autores já comprovaram *in vitro* a hipótese de persistência parasitária como Guevara et al. (1994), utilizando PCR, detectaram DNA parasitário no sangue de pacientes curados e em indivíduos sadios, sem passado de leishmaniose, procedentes de áreas endêmicas. Através da mesma técnica, Schubach et al.

(1998^a) e Mendonça et al. (2004) detectaram DNA parasitário em tecido cicatricial, sugerindo que *Leishmania* possa persistir na pele por muitos anos após tratamento. Schubach et al. (2001), evidenciaram por imunohistoquímica, antígenos parasitários em lesões cicatrizadas de pacientes considerados clinicamente curados. Em outro estudo, os mesmos autores confirmaram um estado de infecção latente por *L. (V.) braziliensis* através da recuperação de parasitas viáveis em lesões cutâneas cicatrizadas há anos (SCHUBACH et al, 1998^b). Aebischer et al. (1993) demonstraram, em ratos, a persistência do parasito vivo após cura clínica por quimioterápicos. Tais resultados sugerem que, para obter a cura clínica, o tratamento não necessita eliminar o parasita (SCHUBACH et al, 2005). Embora o encontro de *Leishmania* na cicatriz sugira a persistência parasitária, a possibilidade de reinfecção não deve ser descartada (OLIVEIRA, 1977; SARAVIA et al, 1990; SCHUBACH et al, 1998^b).

2. JUSTIFICATIVA

Entre os aspectos da LTA ainda não esclarecidos estão os critérios de cura definitiva; a duração da resposta imunológica após a cura clínica; a participação dessa resposta na manutenção do estado de cura ou na evolução para cronicidade; os mecanismos e os determinantes da reativação de lesões cicatrizadas e do surgimento das formas mucosas metastásicas; a participação do tratamento na prevenção de futuras lesões mucosas; e o papel do ser humano doente ou aparentemente sadio no ciclo de transmissão da doença.

Na tentativa de responder alguns destes questionamentos, vários estudos já foram realizados com o intuito principalmente de se comprovar a persistência parasitária nos pacientes clinicamente curados, o que foi demonstrado na maioria deles (AEBISCHER et al, 1993; GUEVARA et al, 1994; SCHUBACH et al, 1998^a; SCHUBACH et al, 1998^b; SCHUBACH et al, 2001; MENDONÇA et al, 2004). Tais achados, no entanto, necessitam ser salientados para que possamos extrapolar algumas afirmações com relação à LC.

Após a demonstração de *Leishmania* por cultivo *in vitro*, imunohistoquímica e PCR em cicatrizes de LC, o papel do ser humano como possível fonte de infecção deve ser levado em consideração (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). Em estudos anteriores, alguns autores, demonstraram que o homem também pode estar incriminado como reservatório alternativo do parasito no ciclo de transmissão doméstico o que explicaria o aparecimento de surtos de leishmaniose em áreas onde a infecção não havia sido reportada (MONTOYA et al, 1990; WEIGLE et al, 1993^b; MONTOYA-LERMA et al, 1998). Contudo, a plausibilidade da transmissão de espécies causadoras de leishmaniose tegumentar do homem para

flebotomíneos tem se tornado cada vez mais evidente (ROJAS; SCORZA, 1989; MONTOYA-LERMA et al, 1998; VERGEL et al, 2006).

Se essa hipótese estiver correta, é necessário questionar se, para se infectar, seria necessário que o inseto picasse nas cicatrizes cutâneas ou se o ser humano poderia albergar *L. (V.) braziliensis* na pele sadia, como acontece com cães domésticos infectados por *L. (L.) chagasi* (DEANE; DEANE, 1955; MADEIRA et al, 2004). Evidência esta, já demonstrada por Vergel et al. (2006) onde os autores detectaram parasitas na pele sadia, em sangue periférico e/ou através de xenodiagnóstico de indivíduos com a doença ativa evidenciando a circulação de *L. (Viannia)* pelo corpo do paciente, permanecendo viáveis para o vetor mesmo após o sucesso terapêutico. Em nosso estudo, foram utilizadas amostras de pele sadia de pacientes curados clinicamente para LTA, contrapondo ao estudo anterior.

No Estado do Rio de Janeiro, o principal diagnóstico diferencial da LTA é a esporotricose, que vem ocorrendo, muitas vezes em áreas superpostas às de leishmanioses, podendo apresentar-se reatoras a IDRMs e a exames sorológicos para leishmanioses, possivelmente por reatividade cruzada ou por coinfeção subclínica (DE LIMA BARROS et al, 2001; BARROS et al, 2004; DE LIMA BARROS et al, 2005; MOUTA-CONFORT, 2009). No “imprint”, as estruturas fúngicas desta doença podem confundir o observador, levando, algumas vezes, a um resultado falso-positivo (comunicação pessoal). Com base neste conhecimento, um grupo controle, composto por pacientes com esporotricose confirmada, foi adicionado ao estudo nos possibilitando a verificação de possíveis reações cruzadas e também, como estamos utilizando a pele sadia de pacientes de LTA, este grupo nos proporcionou a comparação com indivíduos que não tinham LTA (controle saudável). Nenhum outro trabalho anterior havia incluído este grupo, se tornando um diferencial do nosso estudo.

Entender o papel do ser humano neste mecanismo pode ter importantes implicações epidemiológicas na transmissão da *Leishmania* no âmbito de mudanças de condições ambientais de muitos países, especialmente em áreas onde a maioria da população é assintomática (WEIGLE et al, 1993^b).

As principais ferramentas utilizadas nestas buscas foram:

- IDRM: exame de fácil aplicabilidade, muitas vezes realizado no campo, não necessitando de técnicas laboratoriais, apenas de um profissional habilitado para tal;
- Sorologia: técnica realizada em laboratório específico, utilizada principalmente como controle de cura, porém, não deve ser utilizada como confirmação diagnóstica;
- Isolamento *in vitro* de formas promastigotas: utiliza meios de crescimento específico em laboratório – principal ferramenta utilizada no diagnóstico da LTA, no entanto é bastante invasiva, dependendo de uma biópsia para sua realização;
- Exame direto (“imprint”): de fácil aplicabilidade e, assim como no isolamento, depende da biópsia para a aposição em lâmina, porém necessita de técnico extremamente treinado para a visualização microscópica das formas amastigotas de *Leishmania*;
- Exame histopatológico: necessita de laboratório e pessoal especializado para a busca de formas amastigotas, através de biópsia. Uma importante ferramenta utilizada, principalmente, no diagnóstico diferencial, uma vez que é possível a visualização de outras estruturas celulares envolvidas em outras doenças;

- PCR: uma das principais ferramentas, amplamente utilizada devido a sua alta sensibilidade e especificidade perante as outras metodologias, cada vez mais tem se tornando indispensável, principalmente em buscas epidemiológicas e quando as outras ferramentas não conseguem diagnosticar a doença devido a falhas metodológicas ou até mesmo a dificuldade do crescimento ou da visualização do parasito, uma técnica com custo alto e que necessita de laboratórios específicos para sua realização.

Dessa forma, considerando a importância da LTA e a carência de dados sobre a persistência parasitária de *Leishmania* e o papel do ser humano como fonte de infecção para flebotomíneos, nos propomos, utilizando as técnicas citadas acima, detectar e identificar a presença de *Leishmania*, em lesões cutâneas cicatrizadas e na pele sadia de antigos pacientes com LTA com diagnóstico parasitológico positivo na ocasião da doença.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Detectar e identificar a presença de *Leishmania*, por diferentes técnicas, em lesões cutâneas cicatrizadas e pele sadia de antigos pacientes com LTA com diagnóstico parasitológico positivo na ocasião da doença.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Verificar a resposta imunológica celular e/ou humoral sistêmica a antígenos de *Leishmania*
- 2) Verificar a presença de promastigotas viáveis pelo cultivo a partir de fragmentos cutâneos
- 3) Verificar a presença de amastigotas em cicatriz e pele sadia através do “imprint”
- 4) Verificar a presença de amastigotas em cicatriz e pele sadia através do exame histopatológico
- 5) Verificar a presença de DNA de *Leishmania* em cicatrizes cutâneas e na pele sadia
- 6) Identificar em nível subgenérico o DNA de *Leishmania* detectado

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram incluídos 80 pacientes atendidos no ambulatório de Leishmanioses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC)/Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) tratados e curados entre dezembro de 1992 e janeiro de 2006. O grupo de estudo foi constituído por 50 pacientes com LTA diagnosticada por confirmação parasitológica através de pelo menos um dos seguintes métodos: isolamento de *Leishmania* em cultivo, “imprint”, histopatologia e/ou PCR. O grupo controle foi constituído por 30 pacientes com esporotricose confirmada através do isolamento de *Sporothrix schenckii* em cultivo, doença considerada o principal diagnóstico diferencial para LTA no Rio de Janeiro. Este grupo foi incluído para verificação de possível reação cruzada, já descrita para algumas técnicas anteriormente, e também como estamos usando a pele sadia na tentativa de verificar a participação do ser humano no ciclo de transmissão da LTA, este grupo seria incluído como pacientes saudáveis para posterior comparação. Em todos os pacientes foi verificada a presença ou não de sinais clínicos nas antigas lesões cutâneas e o estado das mucosas das vias aero digestivas superiores.

Todos os pacientes retornaram para avaliação clínica entre março de 2003 e julho de 2007, ocasião em que foram convidados a participar do estudo.

Variáveis como: procedência; sexo; data do diagnóstico; data da reavaliação; grupo da época da doença ativa (LTA ou controle); avaliação cutânea na reavaliação; avaliação otorrinolaringológica na reavaliação; resultado do ELISA no diagnóstico e na reavaliação;

resultado da RIFI no diagnóstico e na reavaliação; resultado da IDRM no diagnóstico e na reavaliação; resultado do “imprint” da cicatriz e da pele sadia na reavaliação; resultado do “isolamento” da cicatriz e da pele sadia na reavaliação; resultado da “histopatologia” da cicatriz e da pele sadia na reavaliação; resultado da “PCR” da cicatriz e da pele sadia na reavaliação; peso do fragmento utilizado para PCR (mg); quantificação do DNA extraído pela PCR; tempo entre a cura e a entrada no estudo (meses); data do início do tratamento; data do término do tratamento; tipo de tratamento realizado; droga e dose utilizada no tratamento; tempo de cura do início do tratamento até o desfecho; região biopsiada; número de lesões; foram utilizadas.

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IPEC, sob o número 0015.0.009.000.02 (ANEXO 1). Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2).

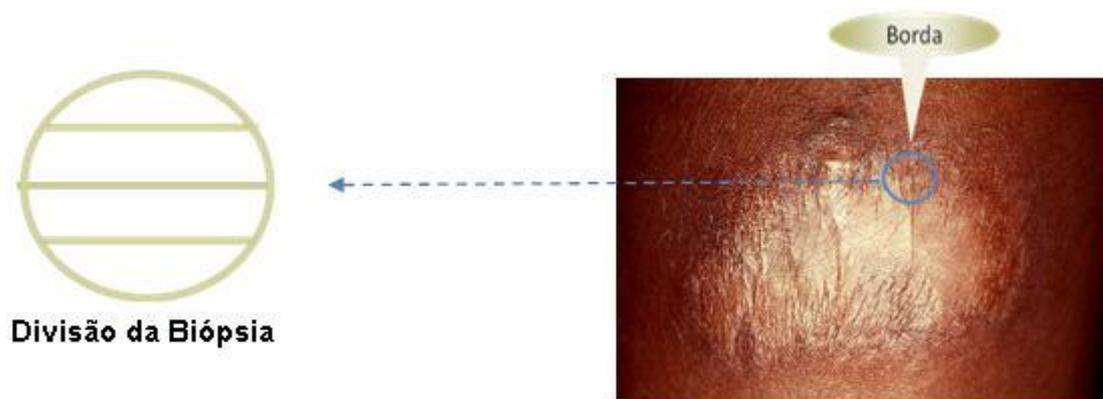
4.2. COLETA DE ESPÉCIMES CLÍNICOS PARA DIAGNÓSTICO

Em ambos os grupos (LTA e controle), após avaliação clínica, dermatológica e otorrinolaringológica, com ótica Hopkins 0° e 90°, o paciente foi submetido à IDRM, coleta de sangue para sorologia de *Leishmania*, além de biópsia da cicatriz e da pele íntegra contralateral para verificação da persistência parasitária nesses sítios.

No caso de LC e do grupo controle, as cicatrizes selecionadas foram aquelas em que o parasita foi anteriormente encontrado na fase de diagnóstico da doença ativa. No caso de LM, foram biopsiadas as cicatrizes consideradas suspeitas de LC. Houve o cuidado na seleção das lesões a serem biopsiadas, para que o resultado final fosse funcional e esteticamente aceitável (foram excluídas lesões na face, genitália, etc).

Após anestesia local com lidocaína a 2%, foi realizada biópsia na borda da cicatriz com o auxílio de “punch” 6mm. Cada amostra foi dividida em quatro fragmentos para as técnicas de: isolamento de *Leishmania* em meio de cultura, “imprint”, exame histopatológico e PCR. Imediatamente após a realização da biópsia o fragmento para isolamento em cultura foi acondicionado em tubo tipo “ependorf” contendo solução salina estéril com antibióticos e

antifúngico (1200U de Penicilina, 1000 μ g de estreptomicina e 100 μ g de 5' fluorocytocine por mL). Para a PCR, o material foi acondicionado em tubo tipo "eppendorf" de 0,5mL e armazenado em freezer -70°C até o processamento. No caso do "imprint" em lâminas de vidro, estas foram fixadas em metanol e armazenadas em temperatura ambiente para posterior coloração. Para o exame histopatológico, o fragmento foi embebido em formaldeído 10% e posteriormente processado. O Esquema 1 mostra como foi realizada a biópsia.



Esquema 1 - Realização da Biópsia

4.3. INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO

Até o ano 2000, foi utilizado o antígeno produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro). Tal antígeno era constituído de suspensão de promastigotas sonicadas da cepa de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) na concentração de 40 μ g de nitrogênio protéico/mL (MELO et al,1977) e veiculado por salina merthiolatada a 1:10.000 (SILVA, 1999). Após o ano 2000, foi utilizado o antígeno produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos, do

Estado do Paraná, contendo 40 μ g de nitrogênio protéico/mL de suspensão de 10⁷ promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Em ambos os casos, o reativo de Montenegro foi disponibilizado pela Coordenação Geral de Laboratórios da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (CGLAB/SVS/MS).

Após assepsia local com álcool 70%, injetou-se 0,1mL de suspensão antigênica na face anterior do antebraço esquerdo, por via intradérmica, com o auxílio de seringa hipodérmica tipo insulina e agulha 13 x 6,5 descartáveis.

Após o teste, os pacientes permaneciam em observação por 30 minutos para verificação de possíveis reações locais e/ou sistêmicas (SILVA, 1999; FAGUNDES et al, 2003). A leitura da reação foi realizada após 48 horas, onde o grau de resposta cutânea foi medido através da delimitação, com caneta esferográfica em inclinação aproximada de 45° com a pele, e posterior medição da área, em milímetros, utilizando régua. A documentação foi feita decalcando papel umedecido em álcool 70% sobre a área demarcada gerando uma impressão da medição do teste. Este resultado foi arquivado no prontuário do paciente. Endurações \geq a 5mm foram considerados reatoras ao teste.

4.4. SOROLOGIA

Amostras de sangue periférico, de ambos os grupos (LTA e controle) foram coletadas em tubo, sem anticoagulantes, de acordo com o protocolo de atendimento de pacientes com LTA, para posterior obtenção do soro.

4.4.1. Ensaio Imunoenzimático

Placas de poliestireno (Nunc Maxisorp®, Nalgene Nunc International®, Rochester, MN®) foram sensibilizadas com 100 μ L de solução antigênica em concentração de 7,5 μ g/mL,

diluída em tampão carbonato-bicarbonato a 0,06M e pH 9,6 e incubadas “overnight” a 4°C. Quatro lavagens com salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,2 (11,68g de Cloreto de Sódio – Merck[®], 1,81g Fosfato de Sódio Dibásico – Merck[®], 0,5g Fosfato de Sódio Monobásico – Vetec[®] e água q.s.p 1 litro com 0,05% de Tween 20 – Reagen[®]), foram realizadas em lavadora automática (Anthos fluido[®], Áustria). Para cada poço da placa foi adicionado 100µL de soro dos pacientes diluídos a 1:40 em solução de leite desnatado (Molico[®]) a 1,0% em PBS 0,01M pH 7,2 e Tween 20 a 0,05% (PBS-T-L), incubando-se por 45 minutos a 37°C em câmara úmida. Mais quatro lavagens foram realizadas e logo após foram adicionados 100µL de anti-Imunoglobulina G (IgG) conjugada à peroxidase diluída em PBS-T-L. A diluição do conjugado foi estabelecida através de titulação prévia. A reação foi revelada utilizando-se 3.3'.5.5'-tetrametilbenzidina e a densidade óptica determinada em absorbância em espectrofotômetro de placa de ELISA – Tecan[®], Áustria (BARROSO-FREITAS et al, 2009).

4.4.2. Reação de Imunofluorescência Indireta

O teste utilizado para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* foi realizado segundo as instruções de uso do kit de RIFI para o diagnóstico da leishmaniose humana (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) onde, resumidamente, antígenos (suspensão de formas promastigotas de *Leishmania* íntegras e preservadas em formalina 2,0%) foram distribuídos em volume de 10µL nas áreas delimitadas de lâminas apropriadas para RIFI e acondicionadas em estufa a 37°C por 2 horas. Os soros dos pacientes e os controles positivo (soro de paciente sabidamente infectado) e negativo (soro de indivíduo saudável), foram diluídos a partir de 1:40 em PBS 0,01M pH 7,2 em poços de microplacas de 96 poços e colocados em volumes de 10µL sobre as áreas delimitadas das lâminas contendo antígeno. Logo após, as lâminas foram incubadas em câmara úmida em estufa a 37°C por 30 minutos e depois deste período foram

imersas duas vezes em PBS 0,01M pH 7,2 por 5 minutos. Em seguida foi realizada uma etapa de lavagem por imersão por 1 minuto em água destilada. Após este período, a lâmina ficou secando por aproximadamente 10 minutos em estufa a 37°C. O conjugado, anti-IgG humana – fluoresceína, foi diluído através da adição de 25µL em cada poço da lâmina de uma solução preparada com azul de Evans em PBS na proporção de 1:25 ficando incubada em câmara úmida por 30 minutos em estufa a 37°C. Novas etapas de lavagens foram realizadas e as lâminas foram colocadas para secar novamente por aproximadamente 10 minutos em estufa a 37°C. Aproximadamente 50 µL de glicerina tamponada foi colocada sobre as lâminas, que ficou sob abrigo da luz e umidade, até o momento da leitura que foi realizada em microscópio de fluorescência na objetiva de 40x (Olympikus[®], Japão).

As reações foram consideradas positivas quando as amostras emitiam fluorescência em diluições iguais ou superiores a 1:40 quando comparadas aos controles positivo e negativo da reação.

4.5. ISOLAMENTO EM MEIO DE CULTURA

Após 24 horas imerso em solução salina contendo antibiótico e antifúngico, o fragmento cutâneo (cicatriz e pele sã) foi semeado em meio de cultura Novy, Nicolle e McNeal (NNN) acrescido de Schneider – Sigma[®] e 10% de Soro Fetal Bovino – LGC[®]. Os tubos foram incubados em temperatura de 26-28°C, em estufa biológica. A procura de formas promastigotas, por exame a fresco em microscópio óptico (Nikon[®], China), foi realizada semanalmente durante 30 dias.

4.6. “IMPRINT”

Esta técnica consiste na aposição do fragmento de tecido em lâmina de vidro. Após secar ao ar ambiente, a amostra foi recoberta com 3mL de álcool metílico (Vetec[®]) por 3-5 minutos, no intuito de se fixar as estruturas celulares. Depois de seco, o material foi corado com solução de Giemsa (Merck[®]), diluído em tampão fosfato pH 7.2 por aproximadamente 25 minutos e depois lavado em fluxo delicado de água. A busca por formas amastigotas de *Leishmania* e de estruturas fúngicas foi realizada com o auxílio de microscópio óptico (Nikon[®], China) utilizando-se objetiva de imersão (aumento de 1000x) nas amostras de cicatriz e de pele sadia.

4.7. EXAME HISTOPATOLÓGICO

Para esta técnica, o fragmento coletado de cicatriz e pele sã de pacientes de LTA, após estar embebido em formalina 10,0%, foi emblocado em parafina, cortado micrometricamente e afixado em lâmina de vidro para posterior coloração por hematoxilina-eosina (HE) na tentativa de se buscar formas amastigotas de *Leishmania* através de microscopia óptica sob imersão (1000x).

Já os pacientes de esporotricose (Controle), além do HE, também foram utilizadas as seguintes colorações: PAS (ácido periódico de Schiff) e prata de Grocott. Estas duas são as usadas para buscar o fungo, também através de microscopia óptica, porém, em aumento de 100 ou 400x (LUNA, 1968).

4.8. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

4.8.1. Extração de DNA dos fragmentos de biópsia

O DNA genômico foi extraído através do kit Illustra tissue and cell Genomic Prep (GE Healthcare®). Inicialmente, o fragmento cutâneo (cicatriz e pele sã) foi lavado em PBS pH 7,2 por centrifugação a 13.000rpm por 1 minuto. A seguir, foi macerado com pistilo motorizado por cerca de 30 segundos e incubado em solução de lise I e 20mg/mL de proteinase K, em banho-maria a 56°C por 1 hora. Após esse tempo, foi adicionado RNase A (20mg/mL) – Invitrogen®, e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Após, passou por nova etapa de lise das células em solução de lise II com incubação a temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, centrifugação a 13.000rpm por 1 minuto e descarte do sobrenadante. O DNA extraído, contido na coluna do tubo, foi precipitado e lavado em tampão de lavagem, centrifugado a 13.000rpm por 3 minutos e teve o sobrenadante descartado. Por último, foi acrescentado tampão de eluição pré-aquecido a 70°C, incubado a temperatura ambiente por 1 minuto, centrifugado a 13.000rpm por 1 minuto e transferido o sobrenadante para tubo tipo "eppendorf" de 1,5mL. O DNA extraído, após esse período, foi quantificado por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose a 1,0% visualizado com brometo de etídeo a 0,5µg/mL (Sigma®) sob luz ultra-violeta. Cada extração de DNA incluiu de 8 a 10 amostras (sendo sempre uma amostra controle, sem DNA).

4.8.2. Avaliação do DNA extraído por espectrofotometria e gel de agarose

Para quantificação do DNA extraído por espectrofotometria, foi utilizado 3µL do DNA extraído acrescido a 57µL de Solução de Hidratação, sendo levado ao vórtex por

aproximadamente 10 segundos. Também foi utilizado um controle (branco), para calibrar o aparelho. Foi medida a concentração (ng/ μ L) de DNA presente na amostra e o grau de pureza (A260/280) onde foram aceitos valores de 1,80 a 2,00 como referência.

Para quantificação em gel de agarose a 1,0%, utilizou-se 1 μ L do DNA extraído acrescentando 3 μ L de azul de bromofenol (corante) – Amershan[®] e 6 μ L de Tampão TBE 1X (Tris – Merck[®] 12,114g/l, Ácido Bórico – Invitrogen[®] 6,183g/l e EDTA – Sigma[®] 0,744g/l). Esta amostra foi aplicada no gel, impregnado por Brometo de Etídeo a 0,5 μ g/mL (Sigma[®]) e após corrida por eletroforese, visualizado em transiluminador e fotografado por sistema L-Pix (Loccus Biotecnologia[®], Brasil).

4.8.3. PCR – Gênero Específico

Para a PCR, 5 μ L do DNA extraído de cada amostra foram utilizados em um ensaio "hot start" com "primers" que amplificam a região conservada da molécula de minicírculo presente em todas as espécies do gênero *Leishmania*, segundo protocolo descrito por Schubach et al. (1998^a) e Pirmez et al. (1999).

Com o DNA a ser amplificado, foram adicionados 100ng de cada "primer" HM2 e HM1+3 (Quadro 1), di-Nucleotídeos Trifosfato (dNTPs) a 200 milimolar, (Invitrogen[®], Carlsbad, California), 2,5 unidades de enzima Taq Polimerase (Amplitaq Gold[®], Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.) 2,5 μ L do tampão fornecido pelo fabricante da enzima, 1,5 milimolar de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), como cofator da enzima e água q.s.p. 25 μ L. A mistura foi incubada em termociclador (Techne Analítica[®], Inglaterra) com o programa de amplificação de 1 ciclo de 94°C por 15 minutos, 30 ciclos de 94°C / 30 segundos, 55°C / 30 segundos, 72°C / 30 segundos, e um ciclo final de 72°C / 10 minutos. Esta amplificação pode detectar até 8,34 picogramas de DNA genômico (SILVA, 2007).

4.8.4. PCR – Subgênero Específico

Para a PCR subgênero específico foi utilizado um ensaio “hot start” com “primers” B1 e B2 (Quadro 1) que amplificam a região variável do minicírculo do DNA do cinetoplasto evidenciando o subgênero *Viannia* (DE BRUIJIN; BARKER, 1992). A mistura processada continha 1,5µL do DNA extraído, 5 picomoles de cada “primer”, 1,5 milimolar de MgCl₂, 0,2 milimolar de cada dNTPs (Invitrogen[®], Carlsbad, California) e 2,5 unidades de enzima Taq Polimerase (Amplitaq Gold[®], Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.) no tampão fornecido pelo fabricante da enzima para um volume final de 50µL. A mistura foi amplificada através do seguinte programa: 1 ciclo de 95°C por 15 minutos, 35 ciclos de 94°C / 30 segundos, 60,5°C / 1 minutos, 72°C / 1 minutos, e um ciclo final de 72°C / 10 minutos em termociclador (Techne Analítica[®], Inglaterra). Esta região pode detectar até 10 fentogramas de DNA genômico (RODRIGUES et al, 2002).

4.8.5. Revelação do produto amplificado

Após a PCR, os produtos amplificados foram revelados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 2,0%, impregnado por brometo de etídio a 0,5µg/mL (Sigma[®]), para visualização de um produto de cerca de 120 pares de bases (bp) para a região genérica e 750bp para a região subgenérica, sob luz ultravioleta. Foi utilizado um marcador de tamanho de DNA de 100bp na concentração de 1µg/µL (Invitrogen[®]), aplicado em um “slot” do gel de agarose.

A eletroforese foi realizada em uma cuba de acrílico onde o gel foi submerso em Tampão TBE 1X. A corrida levou cerca de uma hora e meia em corrente elétrica com aproximadamente 40 de amperagem e 77 de voltagem. Os géis de agarose foram então fotografados em sistema digital L-PIX (Loccus Biotecnologia[®], Brasil).

4.8.6. Controles da reação de PCR

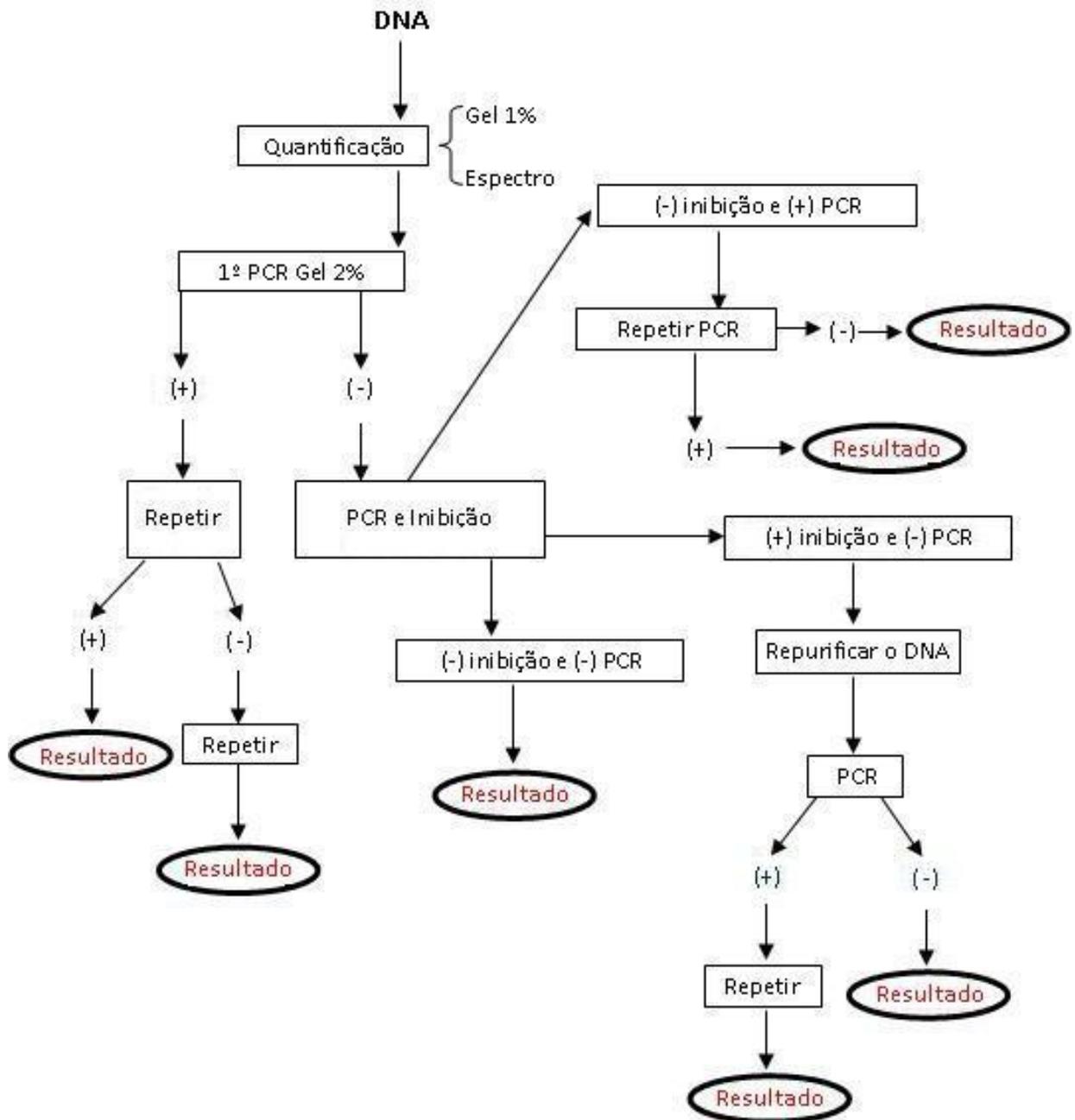
Em cada experimento de amplificação foram adicionadas uma amostra controle negativa, sem DNA, e duas amostras controles positivas, uma com 10 picogramas de DNA extraído de uma cultura axênica de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e outra de um paciente com lesão de LTA ativa e com diagnóstico confirmado pela PCR e pelo isolamento.

Duas amplificações foram realizadas para cada amostra e, quando os resultados foram discordantes, a PCR foi novamente repetida, sendo considerado como resultado final aquele que se repetiu em dois experimentos.

4.8.7. Teste de Inibição

Para a detecção de inibidores da reação, foi realizado um controle interno da PCR que consiste na amplificação do gene constitutivo humano que codifica a subunidade protéica da β -globina. Para tal, foi utilizado 5 μ L do DNA extraído de cada amostra junto a 0,7 picomoles de cada “primer” – B-globF e B-globR (Quadro 1) 0,2 milimolar de cada di-Nucleotídeos Trifosfato (Invitrogen[®], Carlsbad, California), 2 unidades de enzima Taq Polimerase (Amplitaq Gold[®], Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.) no tampão fornecido pelo fabricante da enzima e 1 milimolar de MgCl₂. A mistura foi colocada em termociclador (Techne Analítica[®], Inglaterra) com a programação para 1 ciclo de 95° C por 15 minutos, 45 ciclos de 95°C / 30 segundos, 57°C / 30 segundos, 72°C / 30 segundos, e um ciclo final de 72°C / 10 minutos. Este produto amplificou uma banda de 79bp em eletroforese horizontal visualizado por Brometo de Etídeo 0,5 μ g/mL (Sigma[®]) em gel de agarose a 2,0% (QUARESMA et al, 2009).

O Esquema 2 mostra o fluxograma do protocolo da reação de PCR utilizada.



Esquema 2 - Protocolo de Biologia Molecular (MONTEIRO, 2006)

| “Primer” | Sequências | Região amplificada e tamanho do fragmento |
|----------|--|---|
| HM2 | 5'(G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC 3' | kDNA <i>Leishmania</i> Conservada |
| HM1+3 | 5' GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA 3' | 120bp |
| B1 | 5' GGGGTTGGTGTAATATAGTGG 3' | kDNA <i>Leishmania</i> |
| B2 | 5' CTAATTGTGCACGGGGAGG 3' | Variável 750bp |
| β-Glob F | 5' GCAAGAAAGTGCTCGGTGC 3' | Beta Globina humana |
| β-Glob R | 5' TCACTCAGTGTGGCAAAGGTG 3' | 79bp |

Quadro 1 – “Primers” utilizados para a Amplificação do DNA

4.9. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Todos os resultados obtidos da IDRM, das sorologias, do isolamento em meio de cultura, do “imprint”, do exame histopatológico e da PCR assim como as informações clínica e sócio-demográficas dos pacientes foram armazenadas em banco de dados específico, utilizando o programa Access Microsoft®.

A PCR qualitativa mostra um resultado dicotômico (sim/não) para a presença de DNA de *Leishmania* nas amostras analisadas.

As variáveis selecionadas para o estudo foram: procedência; sexo; data do diagnóstico; data da reavaliação; grupo da época da doença ativa (LTA ou controle); avaliação cutânea na reavaliação; avaliação otorrinolaringológica na reavaliação; resultado do ELISA no diagnóstico e na reavaliação; resultado da RIFI no diagnóstico e na reavaliação; resultado da IDRM no diagnóstico e na reavaliação; resultado do “imprint” da cicatriz e da pele sadia na reavaliação; resultado do “isolamento” da cicatriz e da pele sadia na reavaliação; resultado da “histopatologia” da cicatriz e da pele sadia na reavaliação; resultado da “PCR” da cicatriz e da pele sadia na reavaliação; peso do fragmento utilizado para PCR (mg); quantificação do DNA extraído pela PCR; tempo entre a cura e a entrada no estudo (meses); data do início do

tratamento; data do término do tratamento; tipo de tratamento realizado; droga e dose utilizada no tratamento; tempo de cura do início do tratamento até o desfecho; região biopsiada; número de lesões.

Para os testes estatísticos foram utilizados os pacotes Epi Info[®] e SPSS[®] (Statistical Package for Social Sciences) para Windows[®]. Análises descritivas foram utilizadas para a maioria das variáveis, apenas quando comparamos a proporção de resultados positivos na época da investigação diagnóstica com o estudo atual das variáveis IDRMs e sorologias foi utilizado o teste de qui-quadrado.

Amostras de conveniência foram utilizadas no estudo. Os pacientes com confirmação diagnóstica, tanto para LTA quanto para esporotricose, e com cicatriz a mais de um ano, foram convidados a retornarem ao ambulatório do IPEC para a mesma rotina clínica aplicada em pacientes suspeitos.

5. RESULTADOS

5.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Entre março de 2003 e julho de 2007, foram incluídos 80 pacientes no estudo: 50 com LTA e 30 controles com esporotricose. Na época da doença ativa, todos os pacientes com LTA haviam sido diagnosticados por pelo menos um dos seguintes métodos: isolamento de *Leishmania* em cultivo, "imprint", histopatologia e/ou PCR. Todos os pacientes com esporotricose foram diagnosticados por isolamento de *Sporothrix schenckii* em cultivo sendo tratados com sucesso entre dezembro de 1992 e janeiro de 2006.

No grupo com LTA, o tratamento administrado foi antimoniato de meglumina IM, em 43 pacientes, com aplicações que variaram entre 6 e 130 doses (mediana = 30 doses) de 5mg Sb/kg/dia e em um paciente a dose foi de 10mg Sb/kg/dia em 30 doses. Em quatro pacientes administrou-se desoxicolato de anfotericina B IV 1mg/kg/dia, onde três deles fizeram a máxima dose total recomendada de 1g e um paciente teve administrada a dose total de 0,5g. Um paciente com LC diagnosticada não foi tratado no ambulatório do IPEC e outro, também com diagnóstico para LC, não retornou para o tratamento. No grupo controle os pacientes foram tratados com itraconazol via oral 100-400mg/dia (n=28) ou com calor local (n=1). Um paciente evoluiu para cura espontânea sem tratamento.

Dos pacientes incluídos no projeto, 94,0% do grupo LTA e 33,3% do grupo controle procediam de áreas endêmicas para leishmaniose no Estado do Rio de Janeiro. Campo Grande

e Bangu, de onde vieram 36,0% e 12,0% respectivamente, foram os municípios endêmicos com mais pacientes pertencentes ao grupo de LTA. Do grupo controle, a área endêmica com o maior número de pacientes foi Duque de Caxias (23,3%). Foram consideradas áreas endêmicas aquelas com mais de cinco casos de LTA notificados nos últimos 10 anos (SILVA, 2007; SINAN, 2010).

Todos os pacientes se submeteram a avaliação dermatológica e otorrinolaringológica, nenhum apresentou lesão cutânea ou mucosa em atividade na época da reavaliação.

No grupo LTA, 62% dos pacientes apresentava cicatrizes na parte superior do corpo (membros superiores, cabeça, tronco, vias aero digestivas superiores), 20% nos membros inferiores, 14% em ambos e em 4% a localização foi ignorada. O número de lesões por paciente variou de 1 a 167 (mediana = 1). No grupo controle, a forma clínica mais frequente foi a cutâneo-linfática e o número de lesões variou entre 1 e 25 (mediana = 4), assim distribuídas: 77% em membros superiores, 16,5% em membros inferiores e 6,5% em membros e tronco simultaneamente.

No grupo com LTA, o tempo decorrido entre a cicatrização da lesão e a entrada no projeto variou de 5 meses a 13,2 anos (mediana = 25 meses). No grupo controle, este tempo variou entre 7 e 70 meses (mediana = 46 meses).

As cicatrizes em ambos os grupos (LTA e controle) eram semelhantes, não sendo possível a distinção entre as doenças.

5.2. INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO

Dos 77 pacientes que realizaram a leitura do teste, 82% foram reatores e 18% não reatores, três pacientes não fizeram o exame. A medida das endureções variou entre zero e 77mm (mediana = 12mm). As medianas nos grupos LTA e controle foram 20mm e 6mm, respectivamente na reavaliação. Em ambos os grupos, não houve diferença significativa entre

a proporção de resultados positivos na época da investigação diagnóstica e no estudo atual ($\chi^2=0,00$, $p>0,05$ no grupo de LTA e $\chi^2=1,64$, $p>0,05$ para o grupo controle) (Tabela 1).

Tabela 1 - Intradermorreação de Montenegro - distribuição de pacientes reatores e não reatores para LTA e esporotricose na época do diagnóstico e na reavaliação, após a cura clínica

| Grupo | Diagnóstico | | | Reavaliação | | |
|---------------|-------------|--------|---------------|-------------|--------|---------------|
| | Não Reator | Reator | Não Realizado | Não Reator | Reator | Não Realizado |
| LTA | 4 | 43 | 3 | 3 | 44 | 3 |
| Esporotricose | 12 | 10 | 8 | 11 | 19 | 0 |

5.3. SOROLOGIA

Os resultados do ELISA e da RIFI foram mostrados nas Tabelas 2, 3 e 4. Em ambas as técnicas se observou uma redução da proporção de soros reatores na ocasião da reavaliação, em comparação com a época do diagnóstico, tanto para o grupo de LTA como para o controle. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($\chi^2 = 9,82$, $p<0,05$ para o ELISA e $\chi^2 = 13,09$, $p<0,05$ para a RIFI).

Dentre os pacientes do grupo de LTA e do controle negativos na reavaliação no isolamento, “imprint”, histopatologia e PCR, 20 foram reatores ao ELISA e 14 foram reatores na RIFI.

Tabela 2 - Ensaio imunoenzimático para leishmaniose – distribuição de soros reatores e não reatores para LTA e esporotricose na época do diagnóstico e na reavaliação, após a cura clínica

| Grupo | Diagnóstico | | | Reavaliação | | | | |
|---------------|-------------|--------|------|---------------|------------|--------|------|---------------|
| | Não Reator | Reator | Ind. | Não Realizado | Não Reator | Reator | Ind. | Não Realizado |
| LTA | 6 | 31 | 4 | 9 | 21 | 22 | 6 | 1 |
| Esporotricose | 21 | 1 | 0 | 8 | 27 | 0 | 3 | 0 |

Ind.- Indeterminado

Tabela 3 - Reação de imunofluorescência indireta para leishmaniose - distribuição de soros reatores e não reatores para LTA e esporotricose na época do diagnóstico e na reavaliação, após a cura clínica

| Grupo | Diagnóstico | | | Reavaliação | | |
|---------------|-------------|--------|---------------|-------------|--------|---------------|
| | Não Reator | Reator | Não Realizado | Não Reator | Reator | Não Realizado |
| LTA | 16 | 30 | 4 | 35 | 13 | 2 |
| Esporotricose | 19 | 2 | 9 | 29 | 1 | 0 |

Tabela 4 - Reação de imunofluorescência indireta para leishmaniose - distribuição dos títulos de anticorpos encontrados em paciente com leishmaniose tegumentar americana, na época do diagnóstico e na reavaliação, após a cura clínica

| | Não Reator | Título da Reação | | | | |
|-------------|------------|------------------|------|-------|-------|-------|
| | | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 |
| Diagnóstico | 16 | 16 | 8 | 4 | 1 | 1 |
| Reavaliação | 35 | 5 | 6 | 1 | 0 | 1 |

5.4. ISOLAMENTO

Foram processados 98 fragmentos cutâneos (49 cicatriz e 49 pele íntegra) de pacientes com LTA – um paciente teve apenas a biópsia da cicatriz realizada e outro apenas da pele sã, e 60 (30 cicatriz e 30 pele íntegra) de pacientes do grupo controle. Todas as amostras foram negativas para o isolamento de *Leishmania*. Três amostras do grupo de LTA foram perdidas por contaminação.

5.5. “IMPRINT”

Noventa e oito fragmentos cutâneos (49 cicatriz e 49 pele íntegra) de pacientes com LTA e 56 (29 cicatriz e 27 pele íntegra) de pacientes controles foram processadas em duplicata, totalizando 308 lâminas. Um paciente do grupo de LTA teve apenas a biópsia da cicatriz realizada e outro apenas da pele sadia. No grupo controle, três amostras de pele sadia não puderam ser lidas devido a pouco material celular e em um paciente apenas a amostra da pele sadia foi coletada. Em uma das lâminas de cicatriz de um paciente com LTA visualizou-se formas amastigotas de *Leishmania*. Todas as demais amostras foram negativas.

5.6. HISTOPATOLOGIA

Noventa e seis amostras (49 de cicatriz e 47 de pele íntegra) de pacientes com LTA e 60 (30 de cicatriz e 30 de pele íntegra) de pacientes controles foram processadas. Três pacientes de LTA tiveram apenas a biópsia da cicatriz coletada e um apenas da pele sadia.

Nenhum microorganismo foi visto nas amostras estudadas.

Todas as amostras de cicatriz apresentaram os feixes colágenos espessados e retificados. A epiderme apresentava-se normal, espessada ou retificada, dependendo do tempo de evolução e do grau de fibrose da derme.

Na pele íntegra, as biópsias não apresentaram alterações histopatológicas.

5.7. PCR

Foram processadas 93 amostras de pacientes com LTA (48 cicatriz e 45 pele íntegra) e 59 (29 cicatriz e 30 pele íntegra) dos pacientes controles. Cinco pacientes tiveram coletadas apenas a biópsia da cicatriz e dois apenas a biópsia da pele sã.

O peso dos fragmentos variou entre 0,2 e 41,3mg (mediana = 7,1mg) para ambos os grupos (LTA e controle) e tecidos (cicatriz e pele sadia). A quantidade de DNA extraído variou entre 3 e 137ng/ μ L (mediana = 65ng/ μ L). A Figura 3 apresentou a relação entre a quantidade de DNA total extraído e o tamanho do fragmento cutâneo processado.

Não houve contaminação de amostras na etapa de extração, nem foi detectada a presença de inibidores que pudessem ter interferido na etapa de amplificação.

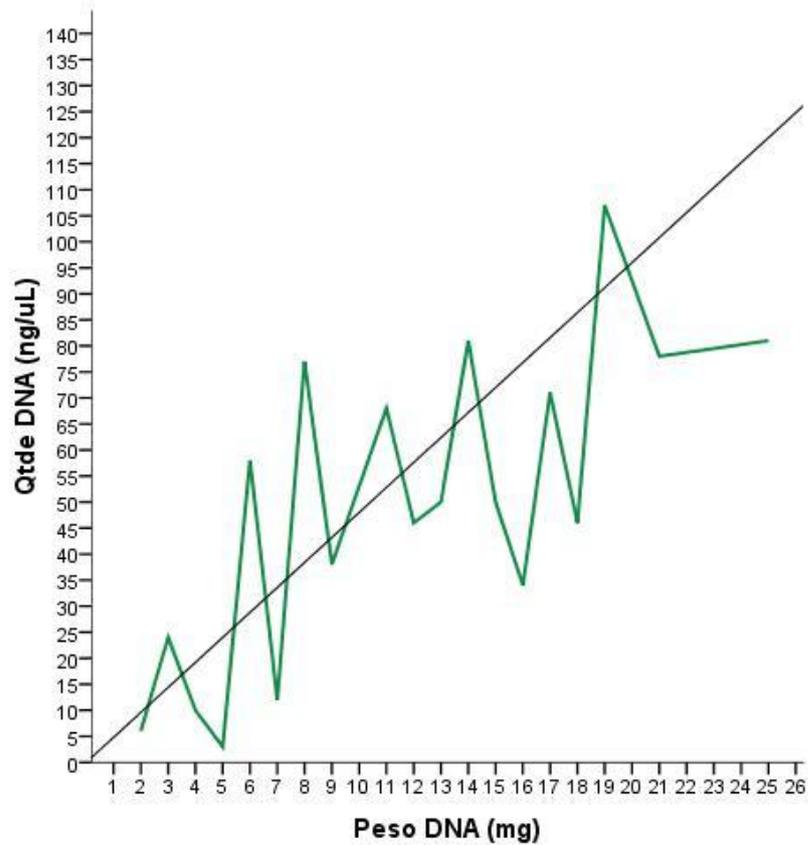


Figura 3 - Relação entre a quantidade de DNA extraído e o tamanho do fragmento cutâneo processado.

Uma amostra de cicatriz do grupo LTA foi positiva para dois pares de “primers” HM2 e HM1+3, região genérica (*Leishmania*) (Figura 4) e B1 e B2, região subgenérica (*Viannia*) (Figura 5). Todas as demais amostras foram negativas.

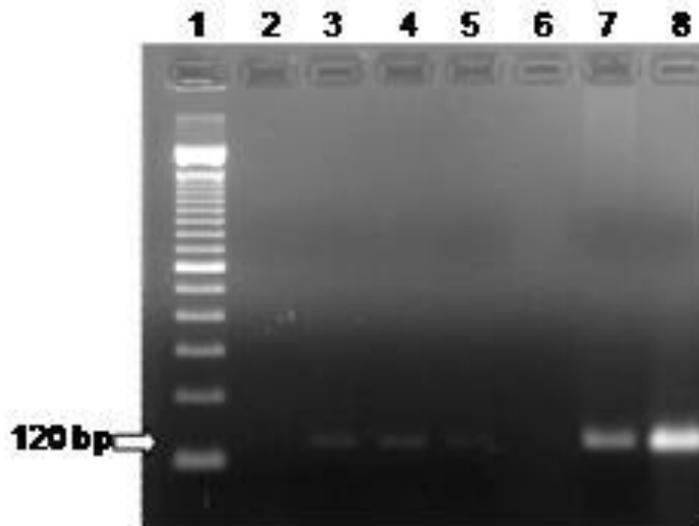


Figura 4 - Amplificação por reação em cadeia da polimerase do kDNA de *Leishmania* extraído de tecido de cicatriz. “Primers” genérico.

Linha 1, marcador de peso molecular de 100bp; *Linha 2*, controle do mix; *Linha 3*, amostra de cicatriz positiva com 10 μ L de DNA; *Linha 4*, amostra de cicatriz positiva com 8 μ L de DNA; *Linha 5*, amostra de cicatriz positiva com 5 μ L de DNA; *Linha 6*, “slot” vazio; *Linha 7*, controle positivo de paciente; *Linha 8*, controle positivo de *L. (V.) braziliensis*.

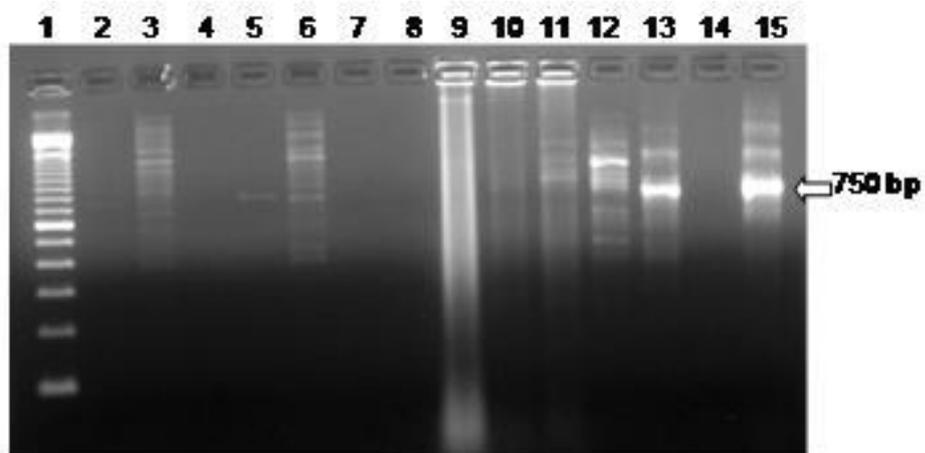


Figura 5 - Amplificação por reação em cadeia da polimerase do kDNA de *Leishmania* extraído de tecido de cicatriz. “Primer” subgenérico.

Linha 1, marcador de peso molecular de 100bp; *Linha 2*, amostra 1; *Linha 3*, amostra de cicatriz positiva concentrada; *Linha 4*, amostra de cicatriz positiva diluída a 1:10; *Linha 5*, amostra de cicatriz positiva diluída a 1:100; *Linha 6*, amostra 2; *Linha 7*, amostra 3; *Linha 8*, amostra 4; *Linha 9-12*, controle de *L. (L.) chagasi*; *Linha 13*, controle positivo de paciente; *Linha 14*, controle de *L. (L.) amazonensis*; *Linha 15*, controle positivo de *L. (V.) braziliensis*.

5.8. RELATO DE CASOS

As principais características dos dois pacientes positivos para *Leishmania* na cicatriz foi apresentada na Tabela 5. Ambos os pacientes pertenciam ao grupo de LTA, foram positivos na cicatriz e negativos na pele sadia e haviam abandonado o tratamento com antimoniato de meglumina 5mg Sb/kg/dia e re-tratados com sucesso com o mesmo esquema. O paciente positivo na PCR foi negativo no isolamento em meio de cultura, no “imprint” e na histopatologia. O positivo no “imprint” foi negativo no isolamento, na histopatologia e na PCR.

Tabela 5 - Principais características dos dois pacientes positivos para *Leishmania* na cicatriz.

| | Paciente A | Paciente B |
|--|----------------|-------------------------|
| Época do diagnóstico de leishmaniose tegumentar | | |
| Sexo | M | M |
| Idade | 45 | 46 |
| Local provável de infecção | Rio de Janeiro | Rio de Janeiro ou Ceará |
| Abandono tratamento | Sim | Sim |
| Tempo total de tratamento | 5 meses | 12 meses |
| Reavaliação | | |
| Tempo após tratamento (idade da cicatriz) | 22 meses | 24 meses |
| Técnica positiva para <i>Leishmania</i> | "imprint" | PCR |
| Lesão cutânea ou mucosa em atividade | Não | Não |
| Intradermorreação de Montenegro | 20mm | 26mm |
| Ensaio imunoenzimático | reator | reator |
| Reação de imunofluorescência indireta | não reator | não reator |

M = Masculino

6. DISCUSSÃO

A maioria dos pacientes clinicamente curados, dos grupos de LTA e controle, foram reatores à IDRМ e alguns deles foram reatores aos testes sorológicos. Tal fato seria justificado por um possível efeito "booster" desencadeado pela segunda aplicação do antígeno de Montenegro (NASCIMENTO et al, 1993; BORGES et al, 2003) ou pela possibilidade de reinfecção devido a permanência desses pacientes em áreas endêmicas ou, até mesmo, por uma permanência da resposta imunológica após a cura clínica (SOUZA et al, 1982; WEIGLE et al, 1991). Assim, em indivíduos com história pregressa de LTA, a IDRМ positiva não tem valor diagnóstico na reavaliação (SILVA, 2007). Um outro fator a ser citado, é a possibilidade de reações cruzadas entre esporotricose (principal diagnóstico diferencial de LTA) e LTA já demonstrado anteriormente tanto para IDRМ quanto para os testes sorológicos (DE LIMA BARROS et al, 2001; BARROS et al, 2004; DE LIMA BARROS et al, 2005; MOUTA-CONFORT, 2009).

Em testes sorológicos os títulos de anticorpos tendem a cair após a cura clínica da doença, porém, nem sempre os pacientes se tornam não reatores. O que já se conseguiu demonstrar, no teste de ELISA, foi que imediatamente após o tratamento os títulos foram significativamente maiores do que na época do diagnóstico, porém, um mês após, os títulos começaram a decrescer (MOUTA-CONFORT, 2009). Mouta-Confort (2009) verificou que em pacientes nos quais os títulos que se mantinham elevados ou tendiam a aumentar após o tratamento, a reativação da doença era frequente, o que não foi observado quando os títulos tendiam a decrescer após a cura clínica. A maioria dos títulos de anticorpos dos pacientes que

participaram do estudo diminuíram e até o momento, nenhuma reativação foi relatada, da mesma forma que os achados do estudo anterior.

A persistência parasitária parece fazer parte da história natural das infecções humanas por *Leishmania* (RAMIREZ; GUEVARA, 1997; CAMERA, 2005). Assim como os resultados sorológicos observados neste estudo, a manutenção do parasito no hospedeiro humano poderia ser responsável pela manutenção prolongada da resposta imune, provavelmente relacionada à imunoproteção ou, contrariamente, a reativação de lesões cutâneas e desenvolvimento de lesões mucosas tardias (SCHUBACH, 1997). Relatos de reativação de lesões em indivíduos que migraram para áreas não endêmicas, onde a reinfecção foi improvável, sugerem que a *Leishmania* possa persistir no organismo humano por longos períodos (GUEVARA et al, 1994). Adicionalmente, em situações de imunossupressão ou de trauma pode ocorrer a reativação da doença (DA-CRUZ et al, 1992; MORGADO et al, 2010). Em áreas com transmissão ativa de leishmaniose, foi difícil a diferenciação entre reativação e reinfecção (RAMIREZ; GUEVARA, 1997). Entretanto, outros estudos demonstraram a persistência parasitária em antigos pacientes com LTA clinicamente curados (GUEVARA et al, 1994; SCHUBACH et al, 1998⁴¹; MENDONÇA et al, 2004; CAMERA, 2005).

O Laboratório de Vigilância em Leishmanioses – IPEC – FIOCRUZ apresenta um alto percentual de sucesso no diagnóstico etiológico de LTA, com sensibilidade de 78% para o isolamento em cultura, 24% para o “imprint” e 40% para o exame histopatológico (SILVA, 2007). Neste estudo, utilizamos estas mesmas técnicas para visualização e isolamento *in vitro* de *Leishmania* em cicatrizes cutâneas de LTA. Surpreendentemente, foram visualizadas formas amastigotas em uma única lâmina de “imprint” de uma cicatriz negativa em todas as outras técnicas e em nenhum dos controles foram visualizadas formas compatíveis com *Leishmania*. Entretanto, o “imprint” é uma técnica pouco sensível e já havia sido negativa nas cicatrizes estudadas por Schubach (1990). Tal resultado poderia ser explicado devido à

casualidade, uma vez que a distribuição do parasita no tecido não acontece de forma uniforme e em se tratando de uma possível baixa de carga parasitária isto seria perfeitamente possível. Como a biópsia é dividida em vários fragmentos é admissível que se encontre parasitas em alguns fragmentos e em outros não. Por outro lado, o isolamento de *Leishmania* em cultivo (SCHUBACH et al, 1998^b; MENDONÇA et al, 2004) e a detecção, por imunohistoquímica, de antígenos parasitários em tecidos cicatriciais (SCHUBACH et al, 2001) haviam sido descritos anteriormente. Nas mesmas amostras de cicatrizes utilizadas no presente estudo, outros autores visualizaram, pela primeira vez, formas amastigotas na imunohistoquímica (MORGADO et al, 2010). Segundo estes mesmos autores o declínio da atividade inflamatória em lesões cicatrizadas é gradual (MORGADO et al, 2010).

A exemplo do que ocorreu no diagnóstico das lesões ativas, é possível que o uso simultâneo de diferentes ferramentas para o diagnóstico de leishmaniose esteja indicado no estudo de cicatrizes de LTA (SCHUBACH et al, 2001; FAGUNDES et al, 2010).

Para a detecção de DNA, utilizamos duas regiões distintas do kDNA: uma gênero *Leishmania* específica, que amplifica a região conservada do minicírculo; e outra, subgênero *Viannia* específica, que amplifica a região variável. Ambas as regiões gênicas foram padronizadas previamente em amostras de lesões ativas. Fagundes et al. (2010) demonstraram alta sensibilidade (92,3%) e especificidade (93,3%) da PCR com a região genérica quando comparada aos métodos convencionais de diagnóstico da LTA. O limiar de detecção desse alvo molecular foi de 1 picograma de DNA (RODRIGUES et al, 2002). Em se tratando de material cicatricial, seria esperado encontrar menor quantidade de DNA no tecido, o que demandaria um método com menor limiar de detecção. Optou-se por utilizar o protocolo para detecção da região variável do kDNA com maior sensibilidade analítica para *Leishmania* (*Viannia*) (DE BRUIJN; BARKER, 1992). Entretanto, na única amostra positiva pela PCR, os

resultados foram idênticos para as duas regiões avaliadas. Todas as amostras do grupo controle também foram negativas, demonstrando uma boa especificidade da técnica.

Em estudo prévio, Schubach et al. (1998^a) detectaram a presença de DNA de *Leishmania* em cerca de 80% das amostras de cicatrizes de pacientes clinicamente curados de LTA. Mendonça et al. (2004), encontraram 93,7% de positividade para DNA do subgênero *Leishmania (Viannia)* em amostras de pacientes curados clinicamente para LTA no Estado de Pernambuco, Brasil. Sabe-se que a prevalência da infecção por *Leishmania* é maior na região nordeste do país (PORTAL DA SAÚDE, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), e que, aparentemente, a forma da doença é mais grave e com maior parasitismo tecidual (GALVÃO et al, 1993; TURETZ et al, 2002; GOTO; LINDOSO, 2010). O único paciente positivo pela PCR no estudo atual, embora morador do Rio de Janeiro na época do tratamento era procedente do Estado do Ceará, região altamente endêmica para leishmanioses, onde poderia ter adquirido a infecção.

Entre as possíveis explicações para a diferença quantitativa de resultados positivos nos estudos anteriores e no estudo atual, podemos considerar: 1) o uso de material congelado, 2) o local da cicatriz biopsiado, 3) o tamanho dos fragmentos, 4) o tratamento com doses baixas de antimônio e 5) a baixa carga parasitária.

No estudo atual, o DNA foi extraído de fragmentos de cicatrizes congeladas a -70°C. Em estudo anterior, Schubach et al. (1998^a) extraíram DNA de cicatrizes emblocadas em parafina. E no estudo realizado por Mendonça et al. (2004), foram utilizadas amostras a fresco.

No presente estudo biopsiou-se o bordo da cicatriz, enquanto Schubach et al. (1998^a) retiraram as amostras do centro da cicatriz. Outros autores referem que a PCR foi mais sensível em fragmentos retirados do centro da lesão ativa que da borda da mesma (80,8% e 57,7% respectivamente) (RAMIREZ et al, 2000).

Outra diferença, entre o estudo atual e os anteriores foi a técnica de retirada do fragmento tecidual. No estudo atual utilizou-se “punch” 6mm e as amostras para as extração de DNA apresentavam um peso mediano de 7,1mg. Em estudos anteriores, foram realizadas incisões em cunha com o auxílio de lâmina de bisturi, obtendo-se fragmentos maiores (SCHUBACH et al, 1998^a) e também obtidas por “punch”, porém com fragmentos pesando aproximadamente 20mg (MENDONÇA et al, 2004). A utilização de pequenos fragmentos teciduais poderia ter diminuído as chances de positividade.

O tratamento da LTA com antimoniato de meglumina 5mg Sb/kg/dia por 30 dias vem sendo utilizado com sucesso na rotina do IPEC – FIOCRUZ (OLIVEIRA-NETO et al, 1996; SCHUBACH et al, 2005), embora esta dose seja inferior a recomendada (10-20 mg/kg/dia por 20 dias) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Seria possível que o tempo de aplicação maior que o recomendado explique parcialmente os bons resultados. Adicionalmente, tal sucesso poderia ser explicado por particularidades da LTA no Estado do Rio de Janeiro, onde a doença foi caracterizada por úlcera cutânea única, com um tempo de evolução curto, baixa carga parasitária e boa resposta imune (SCHUBACH, 1990; OLIVEIRA-NETO et al, 1996). Estudos recentes demonstraram que o antimônio pentavalente exerceu efeitos sobre a resposta imunológica (MUNIZ-JUNQUEIRA; DE PAULA-COELHO, 2008). Estes dados sugeririam que além dos mecanismos “leishmanicidas”, efeitos imunomoduladores do antimônio também estejam relacionados à resposta terapêutica. Seria possível que doses baixas de antimônio estimulasse o sistema imunológico a eliminar parasitos de forma eficaz.

Marzochi e Marzochi (1994) sugeriram que o ser humano possa participar do ciclo de transmissão como possível fonte de infecção para LTA, o que já foi demonstrado e que também explicaria o aparecimento de surtos de leishmaniose em áreas onde a infecção não havia sido reportada (MONTROYA et al, 1990; WEIGLE et al, 1993^b; MONTROYA-LERMA et al, 1998). Alguns autores também tem se referido como hipótese cada vez mais evidente

(ROJAS; SCORZA, 1989; MONTOYA-LERMA et al, 1998; VERGEL et al, 2006). Vergel et al, (2006), suspeitando desta transmissão antroponótica de LTA entre pacientes Colombianos, conduziram um estudo onde foram encontrados 44,1% dos pacientes com evidência de *Leishmania* através de técnicas moleculares e/ou biológicas em pele sadia, sangue periférico, lesões cicatrizadas, ou por xenodiagnóstico (realizado em borda de lesão ativa) antes e após o tratamento, suportando a hipótese sugerida anteriormente e demonstrando que o parasita circula por todo o corpo do homem facilitando a infecção do flebotomíneo. Contudo, em nosso estudo, utilizamos biópsia da pele sadia em todas as técnicas envolvidas neste trabalho, no entanto, a ausência de positividade em ambos os grupos (LTA e controle – pacientes saudáveis) para *Leishmania* não apóia a hipótese aventada acima.

Resultados positivos em pacientes curados reforçam a possibilidade de persistência parasitária e levanta a questão da necessidade de se utilizar mais de um teste para o diagnóstico desta enfermidade, devido à positividade de duas amostras em testes diferentes.

7. CONCLUSÕES

- 1) Os pacientes de LTA e alguns de esporotricose estudados mantiveram resposta imunológica celular *in vivo* e/ou resposta humoral a antígenos de *Leishmania* após a cura clínica
- 2) Não foram isoladas formas promastigotas em cultura dos fragmentos de cicatriz e pele sã nos pacientes estudados
- 3) Formas amastigotas foram visualizadas no "imprint" de uma amostra de cicatriz do grupo LTA, 22 meses após o tratamento, o que reforça a possibilidade da persistência parasitária em pacientes clinicamente curados
- 4) Não foram visualizadas formas amastigotas no exame histopatológico em nenhum dos pacientes estudados
- 5) Foi detectado DNA de *Leishmania (Viannia)* em uma amostra de cicatriz do grupo LTA, dois anos após o tratamento, reforçando a plausibilidade de persistência parasitária
- 6) A negatividade de todas as amostras do grupo controle nas técnicas: de isolamento, do "imprint", da histopatologia e da PCR, demonstra que não ocorreu reatividade cruzada nestas metodologias. E também que foram processadas corretamente, uma vez que não foi

visualizada nenhuma estrutura fúngica no “imprint” e na histopatologia, o índice de contaminação no isolamento foi baixo e a PCR foi bastante específica

- 7) Os resultados sugerem que a cura clínica não seja necessariamente acompanhada pela erradicação dos parasitos das cicatrizes. Entretanto, a carga parasitária pode se reduzir a níveis indetectáveis

- 8) A ausência de positividade para *Leishmania* em todas as amostras de pele sadia não apóia a hipótese da transmissão homem-vetor

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebischer T, Moody SF, Handman E. Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. *Infect Immun*. 1993;61(1):220-226.

Amato V, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77(2):266-274.

Azeredo-Coutinho RB, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007^a;101(7):735-737.

Azeredo-Coutinho RB, Mendonça SC, Callahan H, Portal AC, Max G. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. *J Parasitol*. 2007^b;93(3):688-693.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Jr G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;44(5):536-546.

Barros MB, Schubach AO, do Valle AC, Gutierrez Galhardo MC, Conceição-Silva F, Schubach TM et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin Infect Dis*. 2004; 38(4):529-535.

Barroso-Freitas AP, Passos SR, Mouta-Confort E, Madeira MF, Schubach AO, Santos GP et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103(4):383-389.

Berman J, Wyler D. An *in vitro* model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1980;142(1):83-86.

Berman JD, Chulay JD, Hendricks LD, Oster CN. Susceptibility of clinically sensitive and resistant *Leishmania* to pentavalent antimony *in vitro*. *Am J Trop Med Hyg*. 1982;31(3):459-465.

Berman, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis*. 1988;10(3):560-586.

Borges VC, Ruiz MC, Gomes PM, Colombo AR, Silva LA, Romero HD et al. Montenegro intradermoreaction after the test sequential repetitions in Porteirinha, Minas Gerais State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(2): 249-251.

Botilde Y, Laurent T, Quispe Tintaya W, Chicharro C, Cañavate C, Cruz I et al. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infect Genet Evol*. 2006;6(6):440-446.

Bowdre JH, Campbell JL, Walker DH, Tart DE. American mucocutaneous leishmaniasis. Culture of a *Leishmania* species from peripheral blood leukocytes. Am J Clin Pathol. 1981;75(3):435-438.

Brewster S, Aslett M, Barker DC. Kinetoplast DNA minicircle database. Parasitol Today. 1998;14(11):437-438.

Brewster S, Barker D. Analysis of minicircle classes in *Leishmania* (*Viannia*) species. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002;96 Suppl 1:S55-63.

Camera PO. Mecanismos de persistência de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* em cicatrizes cutâneas humanas. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado] - Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Biologia Celular e Molecular; 2005.

Carvalho EM, Reed SG, Johnson WD Jr. Cross reactivity between *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in the lymphocyte blastogenesis assay. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987;81(1):82-84.

Cupolillo E, Aguiar Alves F, Brahim LR, Naiff MF, Pereira LO, Oliveira-Neto MP et al. Recent advances in the taxonomy of the New World leishmanial parasites. Med Microbiol Immunol. 2001;190(1-2):57-60.

Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto, A et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. J Clin Microbiol. 2003;41(7):3126-3132.

Da-Cruz A, Machado ES, Menezes JÁ, Rutowitsch MS, Coutinho SG. Cellular and humoral immune responses of a patient with American cutaneous leishmaniasis and AIDS. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992;86(5): 511-512.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*-a mini-review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994;89(3):463-469.

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

De Lima Barros MB, Schubach TM, Galhardo MC, de Oliviera Schubach A, Monteiro PC, Reis RS et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96(6): 777-779.

De Lima Barros MB, Schubach A, Francesconi-do-Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach TM, Conceição-Silva F et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio De Janeiro. Acta Trop. 2005;93(1):41-47.

De Lima H, Rodríguez N, Feliciangeli MD, Barrios MA, Sosa A, Agrela I et al. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania chagasi/Le. infantum* in an endemic area of Guarico State, Venezuela. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009;103(7):721-726.

Fagundes A, Marzochi KB, Marzochi MC. Immediate and generalized reaction to Montenegro skin test. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(3):413-4.

Fagundes A, Schubach A, de Paula CC, Bogio A, Antonio L F, Schiavoni PB et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(1):109-112.

Galvão CE, Silva AC, Saldanha AC, Silva CM, Costa MR, Costa JM. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania viannia braziliensis* in the state of Maranhão, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1993;26(2): 121-123.

Gontijo B, De Carvalho ML. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(1):71-80.

Goto H, Lindoso J. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(4): 419-433.

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

Grimaldi Jr G, Kreutzer R D, Hashiguchi Y, Gomez EA, Mimory T, Tesh RB. Description of *Leishmania equatorensis* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1992;87(2):221-228.

Grimaldi Jr G, TESH R. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Ver.* 1993;6(3):230-250.

Guevara P, Rojas E, Gonzalez N, Scorza JV, Anez N, Valera, M et al. Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1994;1(4):385-389.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999;354(9185):1191-1199.

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

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

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(8):811-827.

Lainson R, Rangel EF. Ecologia das leishmanioses: *Lutzomyia longipalpis* e a eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana (LVA) no Brasil. In: Rangel EF, Lainson R, editors. *Flebotomíneos do Brasil.* Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 311-336.

- Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in the New World. In: Collier L, Balows A, Sussman M, editors. Topley & Wilson's. Microbiology and Microbial Infections. London: Parasitology; 2005. p. 313-349.
- Livni N, Abramowitz A, Londner M, Okon E, Morag A. Immunoperoxidase method of identification of *Leishmania* in routinely prepared histological sections. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1983;401(2):147-151.
- Luna L. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. New York: McGraw-Hill, 1968.
- Madeira MF, Schubach AO, Schubach TM, Leal CA, Marzochi MC. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. Braz J Infect Dis. 2004;8(6):440-444.
- Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. Parasitology. 1999; 119:237-246.
- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). Trans R Soc Trop Med Hyg. 1986;80(6):859-876.
- Martinez JE, Alba, Arias L, Escobar MA, Saravia NG. Haemoculture of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from two cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992;86(4):392-394.
- Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses tegumentares. Jornal Brasileiro de Medicina. 1992;63:82-104.
- Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. Cad Saude Publica. 1994;10 Suppl 2:359-375.
- Melo MN, Mayrink W, da Costa CA, Magalhaes PA, Dias M, Williams P et al. Standardization of the Montenegro antigen. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1997;19(3): 161-4.
- Mendonça MG, de Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of *leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? J Infect Dis. 2004;189(6):1018-1023.
- Ministério da Saúde (Brasil). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2006.
- Ministério da Saúde (Brasil). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2010.
- Monteiro VS. Diagnósticos Moleculares das Leishmanioses e normas laboratoriais de qualidade. Rio de Janeiro. Monografia [Graduação] - Centro Universitário Plínio Leite, Curso de Biomedicina; 2006.

Montoya J, Jaramillo C, Palma G, Gómez T, Segura I, Travi B. Report of an epidemic outbreak of tegumentary leishmaniasis in a coffee-growing area of Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990;85(1):119-121.

Montoya-Lerma JR, Palacios R, Osorio L, Jaramillo C, Cadena H. Further evidence of humans as source of *Leishmania Viannia* for sandflies. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93(6):735-736.

Morgado FN, Schubach A, Vasconcellos E, Azeredo-Coutinho RB, Valete-Rosalino CM, Quintella LP et al. Signs of an in situ inflammatory reaction in scars of human American tegumentary leishmaniasis. Parasite Immunol. 2010;32(4): 285-295.

Mouta-Confort E. Ensaio Imunoenzimático com antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado] - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas; 2009.

Muniz-Junqueira M, de Paula-Coelho V. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via TNF-alpha it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. Int Immunopharmacol. 2008;8(12): 1633-1638.

Nascimento MD, Alcântara-Neves NM, Muniz ME, Nunes SF, Paranhos M, de Carvalho LC. Induction and modulation of the immune response to *Leishmania* by Montenegro's skin test. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993;87(1):91-93.

Noyes H, Chance M, Ponce C, Ponce E, Maingon R. *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. Exp Parasitol. 1997;85(3):264-273.

Oliveira MP. Leishmaniasis Recidiva Cutis. An Bras Dermatol. 1977;52:353-359.

Oliveira-Neto MP, Schubach A, Araujo ML, Pirmez C. High and low doses of antimony (Sbv) in American cutaneous leishmaniasis. A five years follow-up study of 15 patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91(2): 207-209.

Oliveira-Neto MP, Mattos M, Pirmez C, Fernandes O, Goncalves-Costa SC, Souza CF et al. Mucosal leishmaniasis ("espundia") responsive to low dose of N-methyl glucamine (Glucantime) in Rio de Janeiro, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2000;42(6):321-325.

Passos VM, Fernandes O, Lacerda PA, Volpini AC, Gontijo CM, Degraive W et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. Acta Trop. 1999;72(3):251-258.

Passos VM, Barreto SM, Romanha AJ, Krettli AU, Volpini AC, Gontijo CM et al. Cutaneous leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte: clinical, laboratorial, therapeutic and prognosis features (1989-1995). Rev Soc Bras Med Trop. 2001;34(1):5-12.

Pirmez C, da Silva Trajano V, Paes-Oliveira Neto M, da-Cruz AM, Goncalves-da-Costa SC, Catanho M et al. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1819-1823.

Portal da Saúde [HOMEPAGE DA INTERNET]. Leishmaniose Tegumentar Americana. [ACESSO EM 11 AGO 2010]. DISPONÍVEL EM: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27512

Ramírez J, Guevara P. Persistent infections by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;92(3): 333-338.

Ramirez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2000;38(10): 3768-3773.

Rodriguez N, Rodriguez A, Cardona M, Barrios MA, McCann SH, Barker DC. *Leishmania (Viannia) guyanensis*: a new minicircle class exclusive to this specie isolated from a DNA cosmid library useful for taxonomic purposes. *Exp Parasitol.* 2000;94(3): 143-149.

Rodrigues AM, Hueb M, Santos TA, Fontes CJ. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol.* 2002;40(10):3572-3576.

Rojas E, Scorza JV. Xenodiagnosis using *Lutzomyia youngi* in Venezuelan cases of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1989;84(1):29-34.

Saravia NG, Weigle K, Segura I, Giannini SH, Pacheco R, Labrada LA et al. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection--reactivation or reinfection? *Lancet.* 1990;336(8712):398-402.

Schubach AO. Estudo da Evolução da Leishmaniose Tegumentar Americana em Pacientes Tratados. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado] - Instituto Oswaldo Cruz, Medicina Tropical; 1990.

Schubach AO. Avaliação da Persistência do Parasito na Pele de Pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado] - Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária, 1997.

Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraive W, Pirmez C, Grimaldi Jr G et al. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis.* 1998^a;178(3):1-4.

Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira AL et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg.* 1998^b;58(6):824-827.

Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, de Oliveira-Neto MP, Mattos MS et al. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96(7):987-996.

Schubach AO, Marzochi KB, Moreira JS, Schubach TM, Araujo ML, Vale AC et al. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(3):213-217.

Shaw J. The leishmaniasis-survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(5):541-547.

Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996;91(6):671-683.

Silva AF. Avaliação do Teste Intradérmico de Montenegro em Populações Militares do Brasil: Positividade e Resposta Inespecífica. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado] - Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária; 1999.

Silva AF. A Reação Intradérmica de Montenegro na clínica e na epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado] - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde-INCQS, Vigilância Sanitária; 2007.

Simpson AG, Lukes J, Roger AJ. The evolutionary history of kinetoplasts and their kinetoplasts. *Mol Biol Evol.* 2002;19(12): 2071-2083.

SINAN [HOMEPAGE DA INTERNET]. Proporção e Listagem de casos de doença de notificação compulsória (DNC) encerrados oportunamente. [ACESSO EM 09 AGO 2010]. DISPONÍVEL EM: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>

Souza WJ, Coutinho SG, Marzochi MC, de Toledo LM, Gottlieb MV. Use of the indirect immunofluorescence test in the therapeutic follow-up of cutaneous leishmaniasis americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1982;77(3):247-253.

Taylor CR. Immunoperoxidase techniques: practical and theoretical aspects. *Arch Pathol Lab Med.* 1978;102(3):113-121.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 2002;186(12): 1829-1834.

Vergel C, Palacios R, Cadena H, Posso CJ, Valderrama L, Perez M et al. Evidence for *Leishmania (Viannia)* parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. *J Infect Dis.* 2006;194(4):503-511.

Vieira-Gonçalves R, Pirmez C, Jorge ME, Souza WJ, Oliveira MP, Rutowitsch MS et al. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *Int J Dermatol.* 2008;47(9):926-932.

Weigle KA, de Davalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NG, D'Alessandro A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;36(3):489-496.

Weigle KA, Valderrama L, Arias AL, Santrich C, Saravia NG et al. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;44(3):260-271.

Weigle KA, Escobar M, Arias AL, Martinez F, Rojas C. A clinical prediction rule for American cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Int J Epidemiol.* 1993^a;22(3):548-558.

Weigle KA, Santrich C, Martinez F, Valderrama L, Saravia NG. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: a longitudinal study of the natural history, prevalence, and incidence of infection and clinical manifestations. *J Infect Dis.* 1993^b;168(3):699-708.

WHO [HOMEPAGE NA INTERNET]. Leishmaniasis. [ACESSO EM 14 AGO 2010]. DISPONÍVEL EM: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>.

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO NO CEP



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



Rio de Janeiro, 07 de maio de 2008.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o estudo “INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE DNA DE *LEISHMANIA* EM LESÕES CUTÂNEAS CICATRIZADAS E PELE SADIAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA CLINICAMENTE CURADOS”, coordenado pelo Dr. Armando de Oliveira Schubach, trata-se de um subprojeto do estudo “AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DO PARASITO EM PACIENTES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA E CORRELAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS”, protocolado neste Comitê sob o nº CAAE-0015.0.009.000-02, tendo sido aprovado em 12 de novembro de 2002.

Dr.ª Léa Camillo-Coury
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC / FIOCRUZ

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 1

INSTITUIÇÃO: INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS (IPEC) – FIOCRUZ

COORDENADOR DA PESQUISA: ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH

ENDEREÇO: AV. BRASIL 4365 - MANGUINHOS - RIO DE JANEIRO - RJ - CEP 21045-900

TELEFONES: (0XX21) 2598-4260 / 2598-4263 / 2598-4266 FAX (0XX21) 2590-9988

NOME DO PROJETO DE PESQUISA: AVALIAÇÃO CLÍNICA, IMUNOLÓGICA, HISTOPATOLÓGICA E PARASITOLÓGICA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA APRESENTANDO LESÕES ATIVAS E CICATRIZADAS

NOME DO VOLUNTÁRIO: _____

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença causada por parasitos chamados leishmanias e que acomete seres humanos e animais. A doença é transmitida pelo "mosquito palha", que vive em regiões de mata, plantações de banana, manga etc. localizadas próximas às moradias humanas, onde costuma entrar para se alimentar de sangue de pessoas e animais domésticos. A LTA se apresenta como feridas na pele de difícil cicatrização. Algumas vezes, a LTA pode se tornar mais grave, envolvendo as mucosas de revestimento interno do nariz e da garganta, mesmo vários anos após a cicatrização da ferida na pele. Atualmente, não temos como saber qual paciente adoecerá de novo e qual permanecerá curado definitivamente.

Outras doenças como infecções por bactérias, micoses, tuberculose, sífilis, tumores etc. podem se manifestar de forma parecida com a leishmaniose e, depois de curadas, pode não ser possível diferenciar as cicatrizes através dos exames utilizados de rotina atualmente.

No momento, várias perguntas precisam ser respondidas como: quais pacientes irão permanecer curados após o tratamento e quais irão reabrir suas cicatrizes ou desenvolver doença dentro do nariz ou na garganta? outras doenças têm sido confundidas e tratadas como LTA? qual o papel dos seres humanos doentes ou aparentemente curados na transmissão da doença?

Pelo presente documento, você está sendo convidado(a) a participar de uma investigação clínica a ser realizada no IPEC, com o objetivo de avaliar o estado clínico e os exames de laboratório de indivíduos com LTA, em diferentes períodos de evolução, assim como o

aspecto microscópico e a presença de leishmanias no sangue e nas lesões de pele ativas ou cicatrizadas comparando-as com amostras de pele sadia e com outras doenças.

Este documento procura esclarecê-lo sobre o problema de saúde em estudo e sobre a pesquisa que será realizada, prestando informações, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você poderá recusar-se a participar de uma ou todas as etapas da pesquisa ou, mesmo, se retirar dela a qualquer momento, sem que este fato lhe venha causar qualquer constrangimento ou penalidade por parte do IPEC. O seu atendimento médico não será prejudicado caso você decida não participar ou caso decida sair do estudo já iniciado. Os seus médicos poderão também interromper a sua participação a qualquer momento, se julgarem conveniente para a sua saúde.

A sua participação com relação ao Projeto consiste em autorizar a realização de uma série de exames para avaliar a evolução da sua doença e que este material seja utilizado neste estudo. Também será necessária a sua autorização para a utilização de documentação fotográfica ou filmagem de suas lesões para estudo e para que parte das amostras coletadas seja estocada a fim de servir para outros estudos que tenham como finalidade a melhor compreensão da doença, o desenvolvimento e avaliação de novos métodos diagnósticos; avaliação da resposta ao tratamento etc., desde que tal estudo seja previamente analisado e autorizado por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Os exames e procedimentos aplicados lhe serão gratuitos. Você receberá todos os cuidados médicos adequados para a sua doença.

Participando deste estudo você terá algumas responsabilidades: seguir as instruções do seu médico; comparecer à unidade de saúde nas datas marcadas; relatar a seu médico todas as reações que você vier apresentar referentes ao estudo, tanto positivas quanto negativas.

Caso você necessite de atendimento médico, durante o período em que estiver participando do estudo, procure o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, mesmo fora do seu agendamento. Em caso de necessidade ligue para o Dr. Armando de Oliveira Schubach ou Dra. Mariza Salgueiro nos telefones acima. Caso você apresente qualquer problema clínico relacionado ao estudo e que necessite de internação, a equipe médica providenciará seu leito no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Sua identidade será mantida como informação confidencial. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade e suas imagens poderão ser divulgadas desde que você não possa ser reconhecido. Entretanto, se necessário, os seus registros médicos estarão disponíveis para a equipe

envolvida no estudo, para o Comitê de Ética em Pesquisa, para as Autoridades Sanitárias e para você.

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo, assim como a qualquer momento. O seu médico deverá oferecer todas as informações necessárias relacionadas à sua saúde, aos seus direitos, e a eventuais riscos e benefícios relacionados à sua participação neste estudo.

Procedimentos, exames e testes que serão utilizados:

Inicialmente haverá coleta de informações sobre a doença; exame médico geral e exame da pele com descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões; exame interno do nariz e da garganta com um aparelho chamado fibra ótica, que permite ver lesões pequenas ou em locais de difícil acesso, para descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões (se necessário será aplicado "spray" anestésico local). Retirada, com anestesia local, de um pequeno fragmento de pele doente (lesão ativa ou cicatrizada) ou de pele sadia, para realização de exames para identificar células e outros componentes do organismo, assim como a possível presença de leishmanias.

Quando indicados, outros exames poderão ser realizados para diagnosticar outras doenças possíveis de ser confundidas com a LTA e para avaliar a resposta do organismo contra as leishmanias: um teste cutâneo (injeção da décima parte de um mililitro de um reativo para LTA na pele da região anterior do antebraço, a qual deverá ser revista cerca de 2 dias após a injeção); e exames de sangue (quantidade equivalente a 2 colheres de sopa).

Inconvenientes e riscos principais conhecidos até os dias atuais:

A coleta de sangue poderá causar alguma dor no momento da punção venosa e, eventualmente, poderá haver a formação de uma área arroxeadada no local, que voltará ao normal dentro de alguns dias.

Ocasionalmente, o teste na pele poderá, apresentar uma reação forte com inflamação do local, mais raramente, formação de bolhas e de ferida. Todo o processo costuma regredir dentro de alguns dias a poucas semanas.

Tanto o teste na pele quanto o anestésico injetado no momento da biópsia (retirada de um pequeno fragmento de pele para exame) poderão causar alergia, geralmente limitada ao aparecimento de áreas vermelhas, empoladas e com coceira na pele e que respondem bem a medicamentos anti-alérgicos. Mais raramente poderá haver uma reação mais severa com dificuldade de respirar e necessidade de cuidados mais intensos, existentes no IPEC.

Eventualmente, no local da biópsia, poderá ocorrer inflamação e dor, acompanhados ou não de infecção por bactérias. Mais raramente a cicatriz poderá reabrir. Caso isso ocorra, poderá ser necessário o uso de medicamentos para dor e antibióticos ou de repetir o tratamento para LTA.

Formas de ressarcimento:

Sempre que necessário, nos dias de seu atendimento, poderá ser fornecida alimentação conforme rotina do Serviço de Nutrição e Serviço Social do IPEC para pacientes externos.

Benefícios esperados:

Espera-se que os exames realizados indiquem que, neste momento, você esteja curado ou necessite de nova investigação ou tratamento. Entretanto, as consultas de retorno regulares por vários anos após o tratamento são indicadas para a confirmação da cura. Os resultados deste estudo poderão não beneficiá-lo diretamente, mas no futuro, poderão beneficiar outras pessoas.

Declaro que li e entendi todas as informações referentes a este estudo e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe médica, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento e pelo presente consinto, voluntariamente, em participar deste estudo de pesquisa.

Nome paciente:

Data

Nome médico:

Data

Nome testemunha¹:

Data

Nome testemunha²:

Data

¹ Apenas no caso de pacientes impossibilitados de manifestar o seu consentimento por escrito. No caso de menores de 18 anos, deverá ser assinado pelo pai, mãe ou responsável legal.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controle Esporotricose 2**INSTITUIÇÃO:** INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS (IPEC) – FIOCRUZ**COORDENADOR DA PESQUISA:** ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH**ENDEREÇO:** AV. BRASIL 4365 - MANGUINHOS - RIO DE JANEIRO - RJ - CEP 21045-900**TELEFONES:** (0xx21) 2598-4260 / 2598-4263 / 2598-4266 FAX (0xx21) 2590-9988**NOME DO PROJETO DE PESQUISA:** AVALIAÇÃO CLÍNICA, IMUNOLÓGICA, HISTOPATOLÓGICA E PARASITOLÓGICA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA APRESENTANDO LESÕES ATIVAS E CICATRIZADAS**NOME DO VOLUNTÁRIO:** _____

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença causada por parasitos chamados leishmanias e que acomete seres humanos e animais. A doença é transmitida pelo "mosquito palha", que vive em regiões de mata, plantações de banana, manga etc. localizadas próximas às moradias humanas, onde costuma entrar para se alimentar de sangue de pessoas e animais domésticos. A LTA se apresenta como feridas na pele de difícil cicatrização. Algumas vezes, a LTA pode se tornar mais grave, envolvendo as mucosas de revestimento interno do nariz e da garganta, mesmo vários anos após a cicatrização da ferida na pele. Atualmente, não temos como saber qual paciente adoecerá de novo e qual permanecerá curado definitivamente.

A esporotricose é uma doença infecciosa causada pelo fungo *Sporothrix schenckii* e que atinge homens e animais. A doença apresenta evolução arrastada, geralmente limitada à pele e tecido subcutâneo, a partir do local onde o fungo foi introduzido por trauma ou sobre a pele previamente irritada. Eventualmente, a doença pode se tornar mais grave, envolvendo a pele a distância, articulações, ossos, sistema nervoso, pulmões e outros órgãos internos.

A esporotricose e a LTA podem se manifestar de forma parecida, mas uma doença precisa ser diferenciada da outra para que se possa iniciar o tratamento correto. Depois de curadas, pode não ser possível diferenciar as cicatrizes através dos exames utilizados de rotina atualmente.

No momento, várias perguntas precisam ser respondidas como: quais pacientes irão permanecer curados após o tratamento e quais irão reabrir suas cicatrizes ou desenvolver doença dentro do nariz ou na garganta? A esporotricose pode confundida e tratada como LTA? Qual o papel dos seres humanos doentes ou aparentemente curados na transmissão dessas doenças?

Pelo presente documento, você está sendo convidado(a) a participar de uma investigação clínica a ser realizada no IPEC, com o objetivo de avaliar o estado clínico e os exames de laboratório de indivíduos com LTA e esporotricose, em diferentes períodos de evolução, assim como o aspecto microscópico e a presença de parasitos no sangue e nas lesões de pele ativas ou cicatrizadas comparando-as com amostras de pele sadia.

Este documento procura esclarecê-lo sobre o problema de saúde em estudo e sobre a pesquisa que será realizada, prestando informações, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você poderá recusar-se a participar de uma ou todas as etapas da pesquisa ou, mesmo, se retirar dela a qualquer momento, sem que este fato lhe venha causar qualquer constrangimento ou penalidade por parte do IPEC. O seu atendimento médico não será prejudicado caso você decida não participar ou caso decida sair do estudo já iniciado. Os seus médicos poderão também interromper a sua participação a qualquer momento, se julgarem conveniente para a sua saúde.

A sua participação com relação ao Projeto consiste em autorizar a realização de uma série de exames para avaliar a evolução da sua doença e que este material seja utilizado neste estudo. Também será necessária a sua autorização para a utilização de documentação fotográfica ou filmagem de suas lesões para estudo e para que parte das amostras coletadas seja estocada a fim de servir para outros estudos que tenham como finalidade a melhor compreensão da doença, o desenvolvimento e avaliação de novos métodos diagnósticos; avaliação da resposta ao tratamento etc., desde que tal estudo seja previamente analisado e autorizado por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Os exames e procedimentos aplicados lhe serão gratuitos. Você receberá todos os cuidados médicos adequados para a sua doença.

Participando deste estudo você terá algumas responsabilidades: seguir as instruções do seu médico; comparecer à unidade de saúde nas datas marcadas; relatar a seu médico todas as reações que você vier apresentar referentes ao estudo, tanto positivas quanto negativas.

Caso você necessite de atendimento médico, durante o período em que estiver participando do estudo, procure o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, mesmo fora do seu agendamento. Em caso de necessidade ligue para o Dr. Armando de Oliveira Schubach ou Dra. Mônica Bastos de Lima Barros nos telefones acima. Caso você apresente qualquer problema clínico relacionado ao estudo e que necessite de internação, a equipe médica providenciará seu leito no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Sua identidade será mantida como informação confidencial. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem

revelar a sua identidade e suas imagens poderão ser divulgadas desde que você não possa ser reconhecido. Entretanto, se necessário, os seus registros médicos estarão disponíveis para a equipe envolvida no estudo, para o Comitê de Ética em Pesquisa, para as Autoridades Sanitárias e para você.

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo, assim como a qualquer momento. O seu médico deverá oferecer todas as informações necessárias relacionadas à sua saúde, aos seus direitos, e a eventuais riscos e benefícios relacionados à sua participação neste estudo.

Procedimentos, exames e testes que serão utilizados:

Inicialmente haverá coleta de informações sobre a doença; exame médico geral e exame da pele com descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões; exame interno do nariz e da garganta com um aparelho chamado fibra ótica, que permite ver lesões pequenas ou em locais de difícil acesso, para descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões (se necessário será aplicado "spray" anestésico local). Retirada, com anestesia local, de um pequeno fragmento de pele doente (lesão ativa ou cicatrizada) ou de pele sadia, para realização de exames para identificar células e outros componentes do organismo, assim como a possível presença de parasitos.

Quando indicados, outros exames poderão ser realizados para diagnosticar outras doenças possíveis de ser confundidas com a LTA e para avaliar a resposta do organismo contra *Leishmania* e *S. schenckii*: um teste cutâneo (injeção da décima parte de um mililitro de um reativo para LTA na pele da região anterior do antebraço, a qual deverá ser revista cerca de 2 dias após a injeção); e exames de sangue (quantidade equivalente a 2 colheres de sopa).

Inconvenientes e riscos principais conhecidos até os dias atuais:

A coleta de sangue poderá causar alguma dor no momento da punção venosa e, eventualmente, poderá haver a formação de uma área arroxeadada no local, que voltará ao normal dentro de alguns dias.

Ocasionalmente, o teste na pele poderá, apresentar uma reação forte com inflamação do local, mais raramente, formação de bolhas e de ferida. Todo o processo costuma regredir dentro de alguns dias a poucas semanas.

Tanto o teste na pele quanto o anestésico injetado no momento da biópsia (retirada de um pequeno fragmento de pele para exame) poderão causar alergia, geralmente limitada ao aparecimento de áreas vermelhas, empoladas e com coceira na pele e que respondem bem a

medicamentos anti-alérgicos. Mais raramente poderá haver uma reação mais severa com dificuldade de respirar e necessidade de cuidados mais intensos, existentes no IPEC.

Eventualmente, no local da biópsia, poderá ocorrer inflamação e dor, acompanhados ou não de infecção por bactérias. Mais raramente a cicatriz poderá reabrir. Caso isso ocorra, poderá ser necessário o uso de medicamentos para dor e antibióticos ou de repetir o tratamento para esporotricose.

Formas de ressarcimento:

Sempre que necessário, nos dias de seu atendimento, poderá ser fornecida alimentação conforme rotina do Serviço de Nutrição e Serviço Social do IPEC para pacientes externos.

Benefícios esperados:

Espera-se que os exames realizados indiquem que, neste momento, você esteja curado ou necessite de nova investigação ou tratamento. Entretanto, as consultas de retorno regulares por vários anos após o tratamento são indicadas para a confirmação da cura. Os resultados deste estudo poderão não beneficiá-lo diretamente, mas no futuro, poderão beneficiar outras pessoas.

Declaro que li e entendi todas as informações referentes a este estudo e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe médica, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento e pelo presente consinto, voluntariamente, em participar deste estudo de pesquisa.

Nome paciente:

Data

Nome médico:

Data

Nome testemunha²:

Data

Nome testemunha²:

Data

² Apenas no caso de pacientes impossibilitados de manifestar o seu consentimento por escrito. No caso de menores de 18 anos, deverá ser assinado pelo pai, mãe ou responsável legal.