



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO MUNICÍPIO
DE JURUTI, PARÁ**

DANIELA CRISTINA SOARES

BELEM
2008

DANIELA CRISTINA SOARES

**EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO MUNICÍPIO DE
JURUTI, PARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Maria Garcez
Co-Orientador: Prof. Dr. Habib Fraiha Neto

BELÉM
2008

Soares, Daniela Cristina

Epidemiologia da leishmaniose tegumentar no município de Juruti, Pará / Daniela Cristina Soares. Belém: Universidade Federal do Pará, 2008.

94f.: il.; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

1. Leishmaniose tegumentar. 2. Epidemiologia. 3. Flebotomíneos. 4. Reação em Cadeia da Polimerase. I. Universidade Federal do Pará. II. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 616.993.161

DANIELA CRISTINA SOARES

EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO MUNICÍPIO
JURUTI, PARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infeciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Maria Garcez
Seção de Parasitologia, IEC

Co-Orientador: Prof. Dr Habib Fraiha Neto
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Banca Examinadora

Prof. Dr Arival Cardoso de Brito
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Prof. Dr. Bento Melo Mascarenhas
Departamento de Zoologia, Museu Emílio Goeldi

Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Belém, julho de 2008

À minha família, que jamais deixou de incentivar minha formação acadêmica;

Ao meu noivo Peterson, pelo carinho e dedicação;

Aos meus orientadores e amigos, Lourdes Maria Garcez e Habib Fraiha Neto, tão generosos na arte de ensinar.



Gaspar Vianna (1885-1914)

Mártir foi, e adicto da ciência da qual, pode ser dito, veio a morrer de “overdose”. Para tudo o que fez, tendo em conta a vida curta que viveu, precocidade e pressa foram palavras definitivas que selaram seu destino. Precocidade, em função do gênio de investigador, cedo provado, e pressa, como na adivinhação do tempo reduzido de que disporia para sua realização científica, afortunada em sua essência, mas, alguma vez, incompleta em seu remate. Nos fastos da ciência médica, ele não morreu.

Ítalo Suassuna, 2006.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Lourdes Maria Garcez, por toda a confiança, incentivo e aprendizado constante nesses dois anos de convivência;

Ao meu co-orientador, Dr. Habib Fraiha Neto, pelo apoio e pelas maravilhosas aulas semanais sobre identificação de flebotomíneos;

À Dra. Lucile Floeter-Winter, da Universidade de São Paulo, e à sua equipe, em especial a Ricardo Zampieri, pelo treinamento em biologia molecular;

À Dra. Ivoneide Silva, da Universidade Federal do Pará, pelo apoio com as aulas da disciplina de treinamento didático e pela ajuda na estadia em São Paulo;

À equipe da coleta geral, em especial à Dra. Heloísa Nunes do Instituto Evandro Chagas, pela colaboração com as coletas de biópsias de pele;

Aos amigos Anadeiva Chagas, Rosângela Trindade, Luis Dickson, Eduardo Mota, Jefferson Miranda, Joyce Favacho, Rita Felix, Gilberto Cesar, Salma Oliveira e Patrick Gomes, do Laboratório de Imunologia do Instituto Evandro Chagas pelos auxílios com as técnicas e pelo carinho com que me receberam;

Ao Sr. Deocleciano Galiza Primo, pelo treinamento em captura e identificação de flebotomíneos fornecido no campo à nossa equipe;

Aos funcionários da Secretaria Municipal de Saúde de Juruti, em especial ao Fábio e Germana, pelo apoio na coleta contínua de biópsias de pele;

À equipe da Biblioteca do Instituto Evandro pelo apoio durante a pesquisa bibliográfica e normatização do texto;

À Dra. Cíntia Oliveira, da Seção de Bacteriologia do Instituto Evandro Chagas, pelo fornecimento de meios para o cultivo de bactérias;

Ao 9º Centro Regional de Saúde do Estado do Pará, pela participação no curso de capacitação aos funcionários da Secretaria Municipal de Saúde de Juruti.

À Secretaria de Estado de Saúde Pública, pelo fornecimento de dados sobre a epidemiologia da leishmaniose tegumentar;

Às amigas Zezé e Kézia por todo carinho e ajuda em São Paulo;

Às amigas Ana Paula Machado, Valdira Cardoro, Leonildes Correia e Helen Araújo, pelo incentivo e amizade;

Ao Laboratório de Geoprocessamento do Instituto Evandro Chagas, pelo fornecimento de mapas;

Aos pesquisadores Jeffery Shaw, Hiro Goto e José Ângelo Lautella Lindoso, pela colaboração neste projeto;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da UFPA;

Ao Instituto Evandro Chagas, CAPES e Alcoa pelo apoio financeiro a este projeto;

Aos meus pais, pelo exemplo, pelas conversas, pela união de nossa família e por sempre acreditarem em mim;

Ao meu noivo Peterson, por abraçar meus dilemas e conquistas com amor;

Aos amigos e todos que contribuíram para esta conquista;

A Deus, por tudo! Sem o qual nada seria fato.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	20
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO.....	21
1.3 VETOR.....	24
1.4 TRANSMISSÃO.....	26
1.5 IMUNOPATOLOGIA.....	27
1.5.1 Leishmaniose cutânea localizada	29
1.5.2 Leishmaniose cutânea disseminada	29
1.5.3 Leishmaniose mucocutânea	29
1.5.4 Leishmaniose difusa anérgica	30
1.5.5 Leishmaniose cutânea disseminada <i>borderline</i>	30
1.6 DIAGNÓSTICO.....	31
1.6.1 Exame Parasitológico	32
1.6.2 Exame Imunológico	33
1.6.3 Diagnóstico Molecular	34
1.7 TRATAMENTO.....	36
1.8 MEDIDAS DE CONTROLE.....	36
1.9 OBJETIVOS.....	37

1.9.1	Geral	37
1.9.2	Específicos	37
2	MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1	DESENHO DO ESTUDO.....	38
2.2	CARACTERÍSTICAS DO MUNICÍPIO E DA ÁREA DE ESTUDO.....	39
2.3	ABORDAGEM DOS SUJEITOS DA PESQUISA.....	39
2.4	COLETA DE MATERIAL.....	41
2.4.1	Assepsia da lesão	41
2.4.2	Escarificação da borda da lesão	41
2.4.3	Biópsia de Pele	41
2.5	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO.....	42
2.5.1	Exame Parasitológico Direto	42
2.5.2	Teste Intradérmico de Montenegro	42
2.5.3	Isolamento de <i>Leishmania</i>	42
2.5.4	PCR em amostra de pele	42
2.6	MÉTODOS MOLECULARES.....	44
2.6.1	Extração de DNA do fragmento de Pele	44
2.6.2	PCR Ribossômico	45
2.6.3	PCR G6PD	46
2.6.4	Eletroforese em Gel de Agarose	47
2.7	CLONAGEM.....	47
2.7.1	Preparo de Bactérias Competentes	48
2.7.2	Ligação do Produto do PCR Ribossômico ao Vetor	48

2.7.3	Transformação	49
2.7.4	Seleção de Bactérias e Extração de DNA Plasmidial em pequena escala - mini-prep	49
2.7.5	Clivagem de DNA Plasmidial com Enzima de Restrição	50
2.8	REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO.....	50
2.8.1	Reação de Precipitação	50
2.9	PESQUISA ENTOMOLOGICA.....	51
2.9.1	Seleção das áreas de coleta	51
2.9.2	Método de Captura	49
2.9.3	Identificação entomológica	51
2.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
3	RESULTADOS	54
3.1	CASOS INCIDENTES NO HOSPITAL FRANCISCP BARROS, JURUTI, PARÁ.....	54
3.1.1	Perfil clínico-epidemiológico dos casos incidentes	54
3.1.2	Procedência dos pacientes com LT	55
3.2	ATENDIMENTO DOS CASOS SUSPEITOS DE LT NOS PONTOS DE COLETA.....	56
3.3	COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONAIS E PCR.....	57
3.3.1	Perfil epidemiológico dos casos de LT confirmados por PCR	58
3.3.2	Casos prevalentes nos pontos de coleta	59
3.4	ISOLAMENTO DE <i>Leishmania</i>	60
3.5	FLEBOTOMÍNEOS EM ÁREA DE IMPACTO DA MINERADORA....	60

3.6	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LT EM JURUTI.....	63
4	DISCUSSÃO	64
5	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
	ANEXOS	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	— Fêmea de flebotômo, em pleno repasto sanguíneo.....	26
Figura 2	— Apresentação clínica da leishmaniose tegumentar.....	31
Figura 3	— Fluxograma para atendimento e abordagem dos sujeitos da pesquisa no Hospital Municipal Francisco Barros, município de Juruti.....	40
Figura 4	— Esfregaço de biópsia de pele.....	43
Figura 5	— Aferição da endureção no antebraço após realização do Teste de Montenegro.....	43
Figura 6	— Captura de flebotomíneos utilizando armadilha tipo Shannon.....	52
Figura 7	— Distribuição sazonal dos casos incidentes de LT notificados com confirmação parasitológica no Hospital Francisco Barros, município de Juruti-Pará no período de janeiro/2007 a dezembro/2007.....	54
Figura 8	— Produtos de PCR em gel de agarose (1,5%). O comprimento do produto de PCR específico para <i>L. (V.) braziliensis</i> é de 234 pb.....	58
Figura 9	— Imagem de satélite destacando o município de Juruti, a base capiranga e as áreas de coleta entomológica.....	61
Figura 10	— Espermatecas de fêmeas de flebotomíneos capturados na área de impacto da mineradora.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 —	Perfil epidemiológico dos casos incidentes de leishmaniose tegumentar atendidos no Hospital Municipal Francisco Barros, Juruti, Pará de janeiro a dezembro de 2007.....	55
Tabela 2 —	Número de casos e localização das comunidades onde residem os pacientes com diagnóstico laboratorial positivo para LT, atendidos no Hospital Municipal Francisco Barros, Juruti, Pará em 2007.....	56
Tabela 3 —	Registro de casos suspeitos, confirmados no exame direto e a etiologia de <i>Leishmania</i> nos atendimentos realizados nos pontos de coletas no Hospital Municipal Francisco Barros, Juruti, Pará em 2007.....	57
Tabela 4 —	Leishmaniose tegumentar em pacientes atendidos no Hospital Municipal Francisco Barros, Juruti, Pará. Comparação da positividade dos métodos de diagnóstico convencionais e PCR.....	57
Tabela 5 —	Perfil epidemiológico dos casos de LT confirmados por PCR.....	59
Tabela 6 —	Casos prevalentes de leishmaniose tegumentar entre os atendimentos realizados no Hospital Municipal Francisco Barros, Juruti, Pará, em diferentes pontos de investigação nos períodos de duas semanas cada.....	59
Tabela 7 —	Flebotomíneos capturados na área de impacto da mineradora.....	62
Tabela 8 —	Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em Juruti.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
C	Citosina
°C	graus Celsius ou graus centígrados
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA	ensaio imunoenzimático
G	Guanina
G6PD	Enzima glicose – 6 – fosfato – desidrogenase
IEC	Instituto Evandro Chagas
IFI	teste de imunofluorescência indireta
LCD	leishmaniose cutânea difusa
LCL	leishmaniose cutânea localizada
LDA	leishmaniose difusa anérgica
LDB	leishmaniose difusa borderline
LMC	leishmaniose mucocutânea
LT	leishmaniose tegumentar
LV	leishmaniose visceral
M	Molar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de bases
PBS	solução salina fosfatada
PCR	reação em cadeia da polimerase
PSG	solução salina glicerolizada
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Sulfato Duodecil de Sódio
SEMSA	Secreteria Municipal de Saúde

SOB	meio de cultura para <i>E. coli</i>
T	Timidina
TA	temperatura ambiente
TAE	solução de Tris, Acetato e EDTA
TE	solução Tris e EDTA
USSrDNA	subunidade menor do DNA do ribossomo
UV	Ultravioleta
V/cm	Volts/centímetro
ng	Nanograma
µg	Micrograma
µl	Microlitro
mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
NNN	Novy, Neal e Nicole
PSG	solução salina glicerolizada
PBS	solução salina fosfatada
RPM	rotações por minuto
RIM	reação intradérmica de Montenegro
SUS	Sistema Único de Saúde

RESUMO

A leishmaniose tegumentar (LT) encontra-se em expansão no Estado do Pará, Brasil. Juruti é um dos 143 municípios desse Estado e atualmente cenário de grandes transformações ambientais devido à mineração de bauxita, o que poderá influenciar o padrão de transmissão. Objetivo: Este estudo buscou elucidar aspectos epidemiológicos relevantes para o controle da LT em Juruti. Materiais e Métodos: A frequência de LT e o perfil dos pacientes no hospital municipal "Francisco Barros" foram determinados de janeiro a dezembro/2007. Espécies de flebotomíneos silvestres existentes no entorno de uma área de prospecção da bauxita foram também descritas, durante levantamento entomológico em janeiro/2008 (armadilha Shannon/18h às 20h/2 noites). Em 21 indivíduos, portadores de lesão cutânea suspeita de LT, biópsias de pele foram realizadas entre fevereiro e junho de 2007. Neste grupo procedeu-se ao diagnóstico parasitológico (esfregaço corado e cultura), molecular e teste intradérmico de Montenegro. Utilizaram-se sondas de DNA ribossomal (PCR-SSUrDNA) gênero-específicas (S4, S12; S17, S18) e de G6PD, para distinguir o subgênero *Viannia* (ISVC, ISVA; ISVC, ISVG) e a espécie *L. (V.) braziliensis* (ISVC, ISVA; ISVC, ISVB). Resultados: No ano de 2007 foram confirmados 42 casos novos de LT, com média mensal inferior a quatro ($3,5 \pm 0,8$), maior frequência em julho (11) e menor em junho e novembro (0). A maioria dos pacientes foi de homens (41/42, 98%) com menos de 20 anos (<10 anos: 30%; 10-20: 57%; 20-40: 12%). A maioria também residia em localidades rurais (33/42, 79%), incluindo áreas impactadas pela mineração (19/42, 45%), e exercia atividades de risco (28/42, 67%). Doze eram funcionários de empresas (29%). A análise molecular das 21 amostras identificou 12 resultados positivos para o gênero *Leishmania* (57%), sendo 11 (52%) parasitologicamente confirmados. A PCR-G6PD identificou 75% das amostras como sendo *L. (V.) braziliensis*. As demais (3/12, 25%) não hibridizaram com os oligonucleotídeos da PCR-G6PD e, por isso, os produtos da reação de nested-PCR SSUrDNA foram clonados e sequenciados, confirmando que se tratavam de *Leishmania (Viannia) sp.* Apenas 9/12 (75%) casos confirmados pelos métodos parasitológico e/ou molecular tiveram reações de hipersensibilidade tardia em resposta ao antígeno de Montenegro, cujos diâmetros variaram de 7 a 40mm ($16,3 \pm 3,2$). Capturaram-se 105 flebotomíneos de 13 espécies nas seguintes frequências: 1- *Lutzomyia (Ps.) geniculata* (23, 22%), 2- *Lutzomyia (Ps.) paraensis* (21, 20%), 3- *Lutzomyia (Ps.) complexa* (18, 17%), 4- *Lutzomyia (Ps.) davisi* (10, 10%), 5- *Lutzomyia (N.) flaviscutellata* (13, 13%) e outras oito espécies (20, 18%). Discussão: Espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, sobretudo *L. (V.) braziliensis* predominam em Juruti, o que é compatível com o extenso diâmetro das reações cutâneas observadas ao antígeno de Montenegro e com os relatos comuns de persistência e recidiva, apesar do tratamento específico. Entre os flebotomíneos antropófilos destacam-se *L. (Ps.) complexa* (17%) e *L. (Ps.) flaviscutellata* (13%) por serem vetores de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* respectivamente, associadas às formas severas da LT humana. Conclusão: Medidas de controle em Juruti devem priorizar a redução da morbidade, diagnóstico precoce, busca ativa de LT humana, vigilância entomológica e de microambientes no entorno da área de impacto de mineração.

ABSTRACT

The tegumentary leishmaniasis (TL) is expanding in Pará State, Brazil. Juruti is one of its 143 municipalities and current scenery of huge environmental changes due to bauxite mining, what can influence the transmission patterns. The aim of this study was to elucidate epidemiological features relevant for the TL control in Juruti. The TL frequency and patients profile in the Municipal Hospital Francisco Barros were determined from January to December/2007. Silvatic phlebotomines species around an area of bauxite prospection were also described during an entomological screening in January, 2008 (Shannon trap/6:00pm to 8:00pm/2 nights). In 21 individuals having cutaneous lesions suspected of TL, skin biopsies were done among February and June, 2007. In this group the parasitological (stained smear and culture), molecular diagnosis (PCR; nested-PCR) and Montenegro Skin Test were done. Primers of ribosomal genus-specific (S4, S12; S17, S18) and of G6PD DNA were used for distinguish subgenus *Viannia* (ISVC, ISVG) and *L. (V.) braziliensis* species (ISVC, ISVA; ISVC, ISVB). In 2007, there were confirmed 42 new cases of LT, with mensal average lower than four ($3,5 \pm 0,8$), highest frequency in July (11) and lowest in June and November (0). Most patients were represented by men (41/42, 98%) younger than 20 years old (<10 years old: 30%; 10-20: 57%; 20-40: 12%). Most were also resident in rural localities (33/42, 79%) including impact mining area (19/42, 45%) and performed activities of risk (28/42, 67%). The companies' workers were 12 (29%). The molecular analyses of the 21 samples identified 12 positive for the genus *Leishmania* (57%), within 11(52%) were parasitologically confirmed. Most positives hybridized extracted DNA with species-specific primers (9/12, 75%), while the others were incompatible with primers for subgenus *Viannia* and for *L. (V.) braziliensis* species, so the samples were cloned and sequencing, what confirmed *L. (Viannia)* sp. Only 9/12 (75%) confirmed cases by parasitological and/or molecular methods had delayed hipersensibility in response to Montenegro antigen, which diameter varied from 7 to 40mm ($16,3 \pm 3,2$). There were captured 105 phlebotomines of 13 species in the following frequency: 1-*Lutzomyia geniculata* (23, 22%), 2-*Lutzomyia paraensis* (21, 20%), 3-*Lutzomyia complexa* (18, 17%), 4-*Lutzomyia davisi* (10, 10%), 5-*Lutzomyia flaviscutellata* (13, 13%) and other eight species (20, 18%). *Leishmania* species of the subgenus *Viannia*, particularly *L. (V.) braziliensis*, predominate in Juruti, what is compatible with the large diameter of the cutaneous lesions observed in response to Montenegro antigen and with the common reports of persistence and reactivation even though the specific treatment. Within the antropophilic phlebotomines highlighted *Lu. complexa* (17%) e *Lu. flaviscutellata* (13%) since are vectors of *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* respectively, associated to the severe forms of human TL. Control measures in Juruti should focus morbidity reduction, early diagnosis, active surveillance of human TL, entomological and micro-environmental surveillance around the impact mining area.

1 INTRODUÇÃO

A região Amazônica encontra-se em constantes mudanças ambientais devido ao processo de desenvolvimento traduzido por instalação de grandes projetos de geração de energia, agropecuários, abertura de rodovias, grande atividade de extrativismo vegetal e mineral (Perreira *et al.*, 2004). Sabe-se que tais atividades produzem impactos na Saúde Pública dadas as alterações dos nichos ecológicos, intensa migração populacional e formação de novos centros urbanos, propiciando o surgimento de várias doenças como as transmitidas por vetores. Entre estas, encontra-se a leishmaniose tegumentar (LT), doença infecto-parasitária causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos popularmente na Amazônia como “tatuquiras” (Lainson & Shaw, 1978).

Esta doença é primariamente uma infecção zoonótica e acomete o homem de forma acidental, causando lesões na pele que se localizam com maior frequência nas partes descobertas do corpo. Em geral, estas feridas são indolores, porém se houver infecção secundária, por falta de limpeza e de curativo, causar dor. Além de lesões cutâneas, a doença pode também causar, de forma tardia, feridas nas mucosas do nariz, da boca e da garganta (leishmaniose mucocutânea - LMC). Isto acontece em geral quando a doença não é diagnosticada e tratada corretamente na sua fase inicial. Outra forma clínica da LT é a leishmaniose cutânea difusa (LCD), de difícil tratamento, que provoca deformações no indivíduo (Lainson & Shaw, 1992; 1998).

O diagnóstico precoce é a melhor forma de evitar as consequências devastadoras da doença, que é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS)

como a segunda doença de maior importância dentre as causadas por protozoários perdendo apenas para a malária (Desjeux, 1996; Thakur, 2006).

Na rede pública de saúde o diagnóstico laboratorial da LT é feito através da visualização de formas amastigotas ao microscópio (Bensoussan *et al.*, 2006). No entanto, esta prática não permite a identificação das espécies de *Leishmania* responsáveis por diferentes formas da doença, principalmente quando há o envolvimento das espécies do subgênero *Viannia*, pela escassez de parasitos na lesão, tornando muitas vezes exaustivo o método e exigindo grande habilidade do microscopista (Marsden, 1985; Lainson *et al.*, 1986). A importância de um diagnóstico preciso é fundamental, pois evita o uso desnecessário de fármacos que, neste momento, representam significativa toxicidade ao paciente e alto custo ao Governo (Steven, 1996).

Durante os últimos anos se tem investido em novas técnicas laboratoriais para melhorar o diagnóstico das lesões suspeitas de LT, como, por exemplo, os ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Vários grupos de pesquisa utilizam a PCR como método de diagnóstico em áreas onde a leishmaniose é endêmica; porém, apesar dos muitos resultados favoráveis, o diagnóstico ainda se baseia em testes tradicionais, por serem mais rápidos e de menor custo (Oliveira *et al.*, 2003; Marfut *et al.*, 2003).

Do ponto de vista epidemiológico é necessária a identificação correta das várias espécies de *Leishmania* responsáveis pela doença em seres humanos e dos vetores envolvidos na transmissão da doença ao homem. Esses esclarecimentos contribuem para a administração adequada do tratamento, medidas de prevenção e controle da doença (Lainson *et al.*, 1986; Volpini *et al.*, 2004).

1.1 EPIDEMIOLOGIA

A LT é uma doença negligenciada que atinge principalmente indivíduos pobres que vivem em zonas rurais, favelas urbanas ou em zonas de conflito (Shaw, 2007). Com poucos investimentos direcionados no controle e prevenção, essa doença já atingiu 12 milhões de pessoas em 88 países, sendo que 350 milhões encontram-se sob o risco de contraí-la. Países como o Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru detêm a maioria dos casos notificados em todo o mundo (90%). Considerando haver notificação compulsória em somente 32 países, o cenário real é certamente mais grave (WHO, 2006).

No Brasil a doença tem sido encontrada em todos os Estados, constituindo uma das afecções dermatológicas que merecem maior atenção. Em dez anos, de 1995 a 2005, foram notificados cerca de 27.000 novos casos. A região Norte contribuiu até 2006 com 40% dos registros da doença no país, demonstrando tratar-se de uma zoonose em franca expansão geográfica (FUNASA, 2007).

No Estado do Pará a ocorrência da doença revelou índices crescentes nos últimos anos, principalmente nos municípios pertencentes à Mesorregião do Baixo Amazonas (Santarém, Oriximiná, Alenquer, Monte Alegre, Itaituba, Juruti, etc.) que no ano de 2006 contribuíram com 23% dos casos de LT registrados no Estado (Fonte: Secretaria de Estado de Saúde Pública – SESPA).

Dentre esses municípios, Juruti se destaca por possuir uma importante reserva de bauxita, cuja exploração pela empresa Alcoa/Omnia Minérios Ltda iniciou em 2005. Uma licença prévia aprovada em 2005 pela Secretaria de Ciência Tecnologia e Meio Ambiente do Estado do Pará (SECTAM) hoje denominada Secretária de Estado

de Meio Ambiente (SEMA) atestou que a mineração é ambiental e economicamente viável para a região.

De acordo com a Secretaria de Saúde do Município de Juruti, durante os anos de 1999 a 2005, foram registrados 85 novos casos de LT em 42 das 178 comunidades rurais do município.

Outra preocupação é o aumento expressivo do número de casos de co-infecção *Leishmania* x HIV observados no país desde o início da década de 1990, e há projeções de seu crescimento contínuo devido à superposição geográfica das duas infecções, como consequência da urbanização das leishmanioses e da interiorização da infecção pelo HIV (FUNASA, 2004).

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

Os parasitos do gênero *Leishmania* pertencem ao sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (Lainson & Shaw, 1978). Apresentam duas formas evolutivas distintas: a) amastigota – tipicamente ovóide ou esférica, sem flagelo livre, encontrada no citoplasma de macrófagos dos hospedeiros vertebrados; b) promastigota – com flagelo livre, encontrada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, podendo ser observada em meio de cultura NNN. As espécies do gênero *Leishmania* são encontradas em países do Velho Mundo e do Novo Mundo e agrupam-se em dois subgêneros, conforme Lainson & Shaw (1992). A classificação em subgêneros é baseada na divisão binária da forma amastigota em promastigota na região do intestino do flebotômíneo. Na região suprapilária ocorre à divisão do subgênero *Leishmania (Leishmania)* e na região peripilária do subgênero *Leishmania (Viannia)*.

As espécies causadoras de LT consideradas de maior importância médica são: (1) *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911; (2) *Leishmania (Viannia) guyanensis* Floch, 1954; (3) *Leishmania (Viannia) lindenbergi* Silveira *et al.*, 2002; (4) *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson *et al.*, 1989; (5) *Leishmania (Viannia) lainsoni* Silveira *et al.*, 1987; (6) *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson & Shaw, 1989 e (7) *Leishmania (leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 (FUNASA, 2007).

De acordo com Grimaldi *et al.* (1987), no Brasil as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* são as mais amplamente distribuídas, sendo causadoras de formas graves da doença. Essas manifestações modulam a resposta imune do hospedeiro, que varia de um pólo de hipersensibilidade, alérgico ao pólo de hiposensibilidade, anérgico, observados clinicamente na LCM e LDA, respectivamente frente ao teste intradérmico de Montenegro.

Leishmania (Viannia) braziliensis é transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos, como *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia wellcomei*, *Lutzomyia complexa* e *Lutzomyia intermedia*, dentre outras. Na Amazônia, a doença é observada em populações que habitam áreas de terra firme (Brasil, 2006).

A *Leishmania (Viannia) guyanensis* ocorre na região ao norte do Rio Amazonas, em áreas de colonização recente. A doença humana, também chamada “pian-bois”, é caracterizada por lesões normalmente ulceradas, únicas ou múltiplas sendo muito raro o comprometimento mucoso. As lesões múltiplas são consequência de picadas simultâneas de vários flebotomos infectados. As principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão são a *Lutzomyia umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani* (FUNASA, 2004).

A *Leishmania (Viannia) naiffi* já foi isolada de casos autóctones nos estados do Pará e Amazonas. Essa espécie é responsável por lesão única que se manifesta no local da picada do inseto. O hospedeiro silvestre é o tatu e o vetor a espécie *Lu. (Ps.) ayrozai* (Lainson *et al.*, 1986).

A *Leishmania (Viannia) shawi* é responsável por casos humanos esporádicos no Amazonas e Pará, e tem como reservatórios vários animais silvestres, como macacos, preguiças e quatis. O vetor identificado pela transmissão é a espécie *Lutzomyia whitmani* (Lainson *et al.*, 1986).

A *Leishmania (Viannia) lainsoni*, registrada apenas na Amazônia, tem a paca como animal suspeito de ser o reservatório natural e, como vetor, *Lu. ubiquitalis*. Normalmente causa no homem lesões simples. Morfologicamente, o tamanho da forma amastigota é, em geral, maior do que as demais espécies pertencentes do subgênero *Leishmania (Viannia)*. A forma promastigota apresenta um flagelo também maior quando comparado as demais espécies (Ikuta & Ishikawa, 2003).

Leishmania (Leishmania) amazonensis é responsável no homem pela leishmaniose cutânea localizada (LCL) e por uma forma de difícil tratamento conhecida por leishmaniose cutânea difusa anérgica (LDA). Seus reservatórios são roedores e marsupiais e *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia olmeca* são seus principais vetores (FUNASA, 2004). É importante considerar este parasito também como potencial causador de leishmaniose visceral atípica, mesmo nos casos em que o exame microscópico e teste sorológico são negativos (Aleixo *et al.*, 2006).

A *Leishmania (Viannia) lindenbergi* foi recentemente descrita, com registro na floresta degradada nos arredores de Belém. O parasito foi isolado de soldados que adquiriram lesões cutâneas quando realizavam manobras militares nesta área à noite. O

provável vetor é *Lu. antunesi* e o hospedeiro silvestre ainda é desconhecido (Silveira *et al.*, 2002).

1.3 VETOR

O conhecimento da fauna de flebotomíneos é de grande importância dada a capacidade desses insetos de transmitir *Leishmania* (Andrade-Filho *et al.*, 2001). Os flebotomos são insetos pequenos, geralmente não ultrapassam 0,5 cm de comprimento, têm pernas longas e delgadas, o corpo densamente piloso e apresentam como característica o voo saltitante e a manutenção das asas eretas, mesmo em repouso (FUNASA, 2007).

Apenas a picada do flebotomo fêmea transmite a doença ao homem. O flebotomíneo contrai o parasito ao sugar o sangue de mamíferos para obter a proteína necessária para a maturação dos óvulos nos folículos ovarianos. A fêmea ovipõe em covas de certos roedores, no tronco de árvores velhas, em paredes de casas arruinadas, em abrigos de animais e no lixo doméstico, pois nesses ambientes a larva encontrará material orgânico, calor e umidade necessários para o seu desenvolvimento (WHO, 2006).

Segundo Young & Duncan (1994), estão presentes na região Amazônica aproximadamente 150 espécies de flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* França, 1924. Os subgêneros *Nyssomyia*, *Psychodopygus* e *Trichophoromyia* agrupam importantes espécies vetoras ou potencialmente vetoras da LT nessa região (Feitosa & Castellón., 2006).

Lutzomyia (Ps) wellcomei descrita por Fraiha *et al.*, (1971) destaca-se devido à sua alta densidade, como por sua notável antropofilia, picando o homem mesmo durante o dia, sendo responsável pela transmissão da *Leishmania (V.)*

braziliensis (Fraiha *et al.*, 1983). As espécies *Lu. amazonensis*, *Lu. squamiventris squamiventris*, *Lu. complexa*, *Lu. intermedia*, e *Lu. whitmani* são consideradas potenciais vetoras deste agente (Dias-Lima *et al.*, 2002; Dias-Sversutti *et al.*, 2007).

Grimaldi *et al.* (1991), em estudos realizados em Rondônia, isolaram de *Lu. (Ps.) davisii* flagelados de *L. (V.) braziliensis* e Basano *et al.*, (2003) isolaram e identificaram nesse mesmo local e vetor o agente *L. (V.) naiffi*. O vetor *Lu. (Ps.) paraensis* também foi envolvido na transmissão de *L. (V.) naiffi*, uma *Leishmania* (Lainson *et al.*, 1994).

Lutzomyia umbratilis é incriminada na transmissão da *Leishmania (V.) guyanensis* na calha norte do rio Amazonas, com ocorrência no município paraense de Monte Dourado, no Estado do Amazonas e em Trombetas-Amapá (Lainson *et al.*, 1976; Feitosa & Castellón., 2006).

Souza *et al.*, (2003) capturaram na reserva florestal do Flona, BR. 163 – Santarém-Cuiabá Km 67, espécies de flebotomíneos responsáveis pela transmissão de *Leishmania*. As mais frequentes foram *Lu. (Ps.) wellcomei/complexa*, *Lu. umbratilis*, *Lu. ubiquitalis* e *Lu. (Ps.) davisii*. Nesse mesmo trabalho verificaram infecção natural por flagelado nas espécies *Lu. whitmani*, *Lu. pilosa*, *Lu. (Ps.) davisii* e *Lu. (Ps.) hirsuta hirsuta*.

O vetor *Lu. flaviscutellata* é um flebotomíneo de hábito noturno, pouco antropófilo. Apesar disto, tem bastante importância, por duas razões: primeiro por transmitir a *Leishmania (L.) amazonensis*, espécie associada à LDA; segundo, porque tanto os reservatórios mamíferos como este vetor podem ser encontrados em quase todo tipo de mata, primária ou secundária (Lainson *et al.*, 1986; Lainson & Shaw, 1968).

Segundo Lainson & Shaw (1979) o conhecimento das flutuações das populações dos flebótomos permite orientar para que se evite frequentar os seus habitats, principalmente durante os períodos do ano em que são mais abundantes, possibilitando assim o controle da transmissão da doença ao homem.



Figura 1 – Fêmea de flebotomo em pleno repasto sanguíneo (Fonte: Brasil, 2007)

1.4 TRANSMISSÃO

Durante o repasto sanguíneo o flebotomo fêmea ingere macrófagos infectados com amastigotas que são liberados da célula no estômago do inseto. Mais tarde, os amastigotas transformam-se em promastigotas. Estes migram para a probóscida do vetor, onde vivem extracelularmente e se multiplicam por divisão binária. Em outro repasto sanguíneo, ao picar um hospedeiro susceptível, as leishmânias são regurgitadas e transmitidas, sendo imediatamente fagocitadas por macrófagos, transformando-se em amastigotas no interior destas células. Os amastigotas se multiplicam e se reproduzem por divisão binária dentro dos macrófagos. Os macrófagos repletos de amastigotas são rompidos e os amastigotas liberados podem infectar outros

macrófagos ou ser sugado pelo vetor durante o repasto sanguíneo, o que daria continuidade ao ciclo (Lainson & Shaw, 1979; Awasthi *et al.*, 2004).

1.5 IMUNOPATOLOGIA

A capacidade das células de defesa em controlar a proliferação das leishmânias ou de sucumbir à sua proliferação depende de vários fatores. Alguns desses fatores dizem respeito à virulência da espécie infectante. Outros, da capacidade do paciente de reagir com uma resposta imunológica eficiente por meio dos linfócitos T e B, estimulando a destruição das leishmânias e ainda um terceiro fator relacionado ao vetor como, por exemplo, a produção de um vasodilatador potente com propriedades imunomodulatórias (maxidilan) secretada durante o repasto sanguíneo (BRASIL, 2006; Camargo & Barcinski, 2003; Aires *et al.*, 2008).

As primeiras células de defesa a reconhecer os promastigotas como microrganismo estranho são as células dendríticas e macrófagos. Estas células são fundamentais para o processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T (Brandonisio *et al.*, 2004). Este evento resulta em fagocitose e a destruição eventual de microorganismos através de enzimas lisossômicas que produz produtos reativos oxigênio e intermediários do nitrogênio, e/ou mecanismos de privação de nutrientes (Stafford *et al.*, 2002). Porém, a *Leishmania* possui moléculas de superfície que interferem na atividade do macrófago como a gp63 que degrada enzimas lisossômicas, o lipofosfoglicano (LPG) que inibe a geração de metabólitos oxidativos, a fosfatase ácida, que bloqueia a produção de radicais de oxigênio. Fatores inerentes ao hospedeiro e ao parasito são determinantes para a evolução da infecção (Brasil, 2006).

Em geral, parasitos intracelulares como a *Leishmania* induzem uma resposta celular mediada por linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1. Está bem documentado que

resposta imune tipo Th1 é o evento-chave para a prevenção de infecção por *Leishmania* (Awasthi *et al.*, 2004).

A dicotomia Th1 versus Th2 gera um mecanismo imunológico de controle de resistência versus suscetibilidade, respectivamente. Este fato está definido em murinos infectados com *L.(L.) major* (Reiner & Locks-Ley, 1995).

Muitos fatores são determinantes no processo de diferenciação de linfócitos T virgem (Th) adquira fenótipo do tipo Th1 ou Th2. A presença de citocinas, como IL-12 e IL-4, respectivamente, é considerada fator primário para ativação das células T CD4+ (Jankovic *et al.*, 2001).

Macrófagos infectados com *Leishmania* processam e apresenta o antígeno por MHC de Classe II à célula T CD4+ e dão ao antígeno sinal específico para células T. Moléculas co-estimulatórias, como CD80/86, fortalecem o sinal primário, por interagir com CD28 de células de T. A outra interação de CD40-CD40L também é necessária para aumentar a resposta imune Th1. O receptor CD40 do macrófago interage com ligante CD40-L de células T e passa a produzir o IL - 12. A liberação de IL-12 para receptores de células T aumenta a produção de IFN- γ no macrófago. O IFN- γ atua sobre os macrófagos induzindo a morte do parasito (Awasthi *et al.*, 2004).

Linfócitos T CD8+ também são responsáveis pelo mecanismo imunológico de cura em camundongos infectados por *L. (L.) major*, *L. (L.) amazonensis* e *L.(L.) donovani*. A ativação antígeno-específica de células T CD8+ tem mostrado produção de IFN- γ que pode ter efeito citolítico (CLT) em macrófagos parasitados (Muller *et al.*, 1993).

1.5.1 Leishmaniose cutânea localizada

A manifestação clínica comum da LT é a leishmaniose cutânea localizada (LCL), que pode ser causada por uma das sete espécies de *Leishmania* presentes no estado do Pará. As lesões são ulceradas, com bordas elevadas, endurecidas, com fundo granuloso, freqüentemente localizada nos membros inferiores (Basano & Camargo, 2004; Gontijo & Carvalho, 2003; Brasil, 2006). Na LC, os amastigotas se reproduzem na derme e não espalham além do local da picada do vetor (Silveira *et al.*, 2004).

1.5.2 Leishmaniose cutânea disseminada

A leishmaniose cutânea disseminada (LCD) apresenta polimorfismo das lesões, sendo possível encontrar formas impetigóide, liquenóide, tuberculóide ou lupóide, nodular, vegetante e ectimatóide, devido às múltiplas picadas do flebotomíneo ou à disseminação do parasito *Leishmania (V.) braziliensis*. As lesões surgem após um período de incubação variável de 10 dias a três meses, como uma pápula eritematosa que progride lentamente para nódulo. Acompanha-se de adenopatia regional, com ou sem linfangite, em 12 a 30% dos casos (FUNASA, 2007).

1.5.3 Leishmaniose mucocutânea

A leishmaniose mucocutânea (LMC) é doença destrutiva da mucosa da boca, nariz e garganta, comum em áreas de transmissão de *Leishmania (V.) braziliensis*, e normalmente acontece meses ou anos depois da leishmaniose cutânea (Lainson *et al.*, 1986). No Brasil a LMC tem sido assinalada em todos os Estados, constituindo uma das afecções dermatológicas que merece maior atenção, devido à magnitude da doença, pelo risco de ocorrência de deformidades, bem como pelo envolvimento psicológico, com

reflexos no campo social e econômico por ser considerada uma doença ocupacional (FUNASA, 2007).

1.5.4 Leishmaniose difusa anérgica

A leishmaniose difusa anérgica (LDA) é caracterizada pelo aparecimento de lesões múltiplas pleomórficas, em duas ou mais áreas do corpo, e ocorre quase que exclusivamente dentro das regiões Norte e Nordeste do Brasil (Grimaldi & Tesh, 1993). A espécie responsável é a *Leishmania (L.) amazonensis*, sendo que a doença está associada a uma resposta imunológica antígeno-específica ineficiente. Na maioria dos casos é apenas controlável, sem ocorrer a cura (Lainson & Shaw, 1978). No entanto, Silveira & Mayrink (1997) relataram um caso de cura depois de vinte e quatro anos de doença, após tratamento combinado de quimioterapia com imunoterapia. A severidade da doença é dada sua disseminação, que se assemelha a lesões da hanseníase, recaindo espontaneamente depois do tratamento.

1.5.5 Leishmaniose cutânea disseminada *borderline*

A expressão “leishmaniose cutânea disseminada *borderline*” (LDB) foi descrita por Silveira *et al.* (2004, 2005) como forma intermediária entre a LCL e os pólos extremos patogênicos LMC e LDA. A LDB é causada pela espécie *L. (L.) amazonensis*, parasito também responsável pelas formas clínicas LC e LDA. Sua forma clínica é mostrada na Figura 3. A evolução da doença é um processo rápido, podendo ocorrer em dois ou três meses, com 100 ou mais pápulas eritromatosas (lesão acneiforme), lesão ulcerada pode aparecer. Durante a disseminação do parasito o teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* e os ensaios de proliferação de linfócitos são geralmente negativos, refletindo alguma inibição dos mecanismos imunes

mediados por célula T nos pacientes. Isto induziu à adoção do termo “borderline” em uma tentativa de caracterizar uma falha incompleta da resposta imune celular em controlar a infecção leishmaniótica.

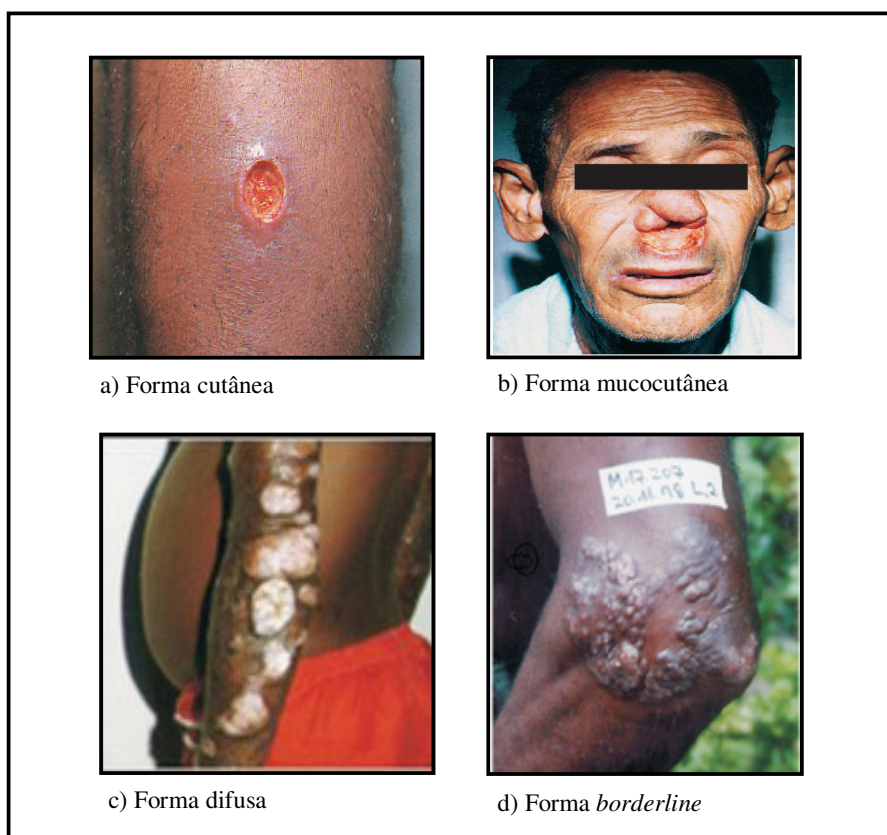


Figura 2 – Apresentação clínica da leishmaniose tegumentar americana. Fonte: (fotografias a, b e c) Lainson & Shaw (1998); (fotografia d), Silveira *et al.*, 2005.

1.6 DIAGNÓSTICO

De acordo com o Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar, o diagnóstico pode ser realizado através de exames clínicos, dados geográficos e exames laboratoriais, conjuntamente. O diagnóstico clínico é realizado pelo profissional médico, que caracteriza as lesões encontradas na pele do paciente (FUNASA, 2004).

O diagnóstico de dados epidemiológicos busca averiguar a existência de casos de LT na região, procedência de área endêmica (viagem de lazer ou trabalho, residência anterior); referência de cães ou eqüinos com lesões, residindo nas proximidades; inserção em áreas florestais. Nas lesões cutâneas, os dados epidemiológicos referidos são recentes (em média 2 meses); no caso de lesão mucosa é essencial buscar também a história progressiva de ulceração de pele de longa duração, além da existência de cicatriz e utilização de medicamentos para leishmaniose (FUNASA, 2007).

1.6.1 Exame Parasitológico

O exame parasitológico pode ser realizado mediante métodos de escarificação, punção aspirativa e biópsia de pele com impressão por aposição, em que após coloração pelo Giemsa verifica-se a forma amastigota na lâmina. A biópsia, quando conservada em formol a 10%, possibilita a pesquisa de antígeno de *Leishmania* por meio de técnicas de imunohistoquímica e pesquisa de amastigotas coradas com hematoxilina-eosina.

A cultura do parasito é realizada para o isolamento, sendo o meio mais empregado o ágar-sangue de Novy e Neal modificado por Nicolle – NNN. Esse procedimento, contudo, exige facilidade laboratorial e pessoal treinado, muitas vezes não disponível nos serviços de saúde, o que o torna inadequado para inquérito epidemiológico de larga escala (Gontijo & Carvalho, 2003).

Outra forma de diagnóstico parasitológico é a inoculação em animais de laboratório, de preferência *hamsters* (*Mesocricetus auratus*) nas patas posteriores ou focinho. Além do longo tempo necessário para a evolução da lesão no modelo animal (2

a 9 meses, em média), a eficácia do isolamento apresenta grande variação conforme a espécie de *Leishmania* (FUNASA, 2004).

O material isolado diretamente de meios de cultura e/ou animais de experimentação pode ser caracterizado pelo perfil de enzimas por eletroforese ou através da técnica de anticorpos monoclonais descrita por Shaw *et al.*, 1989.

1.6.2 Exame Imunológico

O teste intradérmico de Montenegro utiliza o antígeno de *Leishmania* é um importante método para diagnóstico da leishmaniose tegumentar, amplamente empregado em estudos epidemiológicos para a identificação de indivíduos expostos e sem doença e de indivíduos curados de infecção causada pela *Leishmania* (José *et al.*, 2001). A reação intradérmica é caracterizada por uma forte resposta celular mediada por células T e normalmente é positiva em lesões cutâneas ou mucocutâneas, como também em pacientes de leishmaniose visceral (LV) curada (Steven, 1996). O teste é regularmente negativo em casos de leishmaniose difusa anérgica -LDA (Lainson *et al.*, 1994).

O diagnóstico sorológico é realizado por imunofluorescência indireta (IFI) e pelo teste imunoenzimático (ELISA), que expressam os níveis de anticorpos circulantes. As reações IFI e ELISA são úteis principalmente nos casos com lesões extensas e múltiplas ou de lesões mucosas. Em pacientes com a forma cutânea observam-se anticorpos da classe IgM em casos com evolução inferior a 4 meses. Títulos elevados de IgG são encontrados em pacientes com mais de uma lesão. A IFI apresenta reação cruzada com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e com *Trypanosoma cruzi*, entre outros. Após o tratamento e cura em ambas as formas de doença, os títulos podem cair ou desaparecer em alguns meses (FUNASA, 2004).

1.6.3 Diagnóstico Molecular

Durante os últimos dez anos, o diagnóstico dos agentes infecciosos começou a incluir o uso de técnicas para detecção de moléculas de DNA desse agente dada a necessidade de identificação específica. Apesar do começo lento em desenvolver estes ensaios, o progresso adicional e a utilização do DNA em ensaios para descobrir esses agentes podem conferir-lhe um importante papel na epidemiologia, prevenção e tratamento de doenças parasitárias (Weiss, 1995).

Desde que Willian Leishman identificou a presença de amastigotas no interior de macrófagos de pacientes até os dias atuais utiliza-se a técnica da observação direta de amastigotas na rotina dos laboratórios da rede pública de saúde. Com a implantação da PCR nos centros de pesquisas este método passou a ser utilizado em ensaios de diagnóstico com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade da metodologia clássica. Diversos alvos vêm sendo utilizados para a detecção desses parasitos, dentre eles: kDNA, *locus* do rDNA, *locus* do mini-exon, gene da β -tubulina, gene da gp63, fragmentos gerados por RAPD, seqüências repetitivas, microsatélites, seqüências subteloméricas (Flöeter-Winter e Shaw, 2004; Saiki *et al.*, 1985).

Dentre os alvos se pesquisa o DNA da região da subunidade menor do ribossomo (SSUrDNA), descrita por Savani *et al.* (2004), que identifica uma região altamente conservada e distingui o gênero *Leishmania* de outros Tripanossomatídeos e de outros agentes infecciosos causadores de lesões cutâneas (Uliana & Floeter-Winter, 1996; Fernandes *et al.*, 1993; Schnare *et al.*, 2000). Um importante alvo para a distinção das espécies de *Leishmania* é o gene da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) devido às seqüências espécie-específicas de *L. (V.) braziliensis* capazes de diferenciar este dos outros organismos do subgênero *Viannia*. Como esta é a principal espécie

associada à LMC, a identificação pode ser usada em estudos clínicos e epidemiológicos para testes quimioterapêuticos e estratégias de controle dessa zoonose (Castilho *et al.*, 2005).

1.7 TRATAMENTO

O tratamento da LT é um desafio para os médicos, porque as drogas disponíveis apresentam elevada toxicidade e sérios efeitos adversos. A recidiva, a falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos e a resistência ao tratamento são fatores que motivam a busca de uma droga ideal (Lima *et al.*, 2007). Apesar disso, a droga de primeira escolha para o tratamento de todas as formas clínicas desta doença mesmo em casos de co-infecção *Leishmania*-HIV, é ainda o antimonial pentavalente. Este medicamento foi utilizado em 1912 pelo médico paraense Gaspar Vianna e apresenta graves efeitos colaterais sobre as células cardíacas, renais, hepáticas não podendo ser administrado em gestantes. Além desse fármaco, o Ministério da Saúde recomenda os medicamentos anfotericina B (na apresentação desoxicolato e lipossomal) e pentamidina, como drogas de segunda escolha para o tratamento da LT (FUNASA, 2007).

Contudo, alguns antibióticos utilizados em infecções bacterianas e fúngicas vêm sendo testados na busca por um fármaco mais seguro e eficaz. A azitromicina, por exemplo, apresentou resultado satisfatório em lesões cutâneas causadas por *Leishmania (V.) braziliensis* (Prata *et al.*, 2003). Mas quando testada em Manaus, onde predomina a espécie *Leishmania (V.) guyanensis*, os resultados mostraram baixa eficácia (Teixeira *et al.*, 2007).

Pesquisa clínica de Consigli *et al.* (2006) consideraram o itraconazol como droga opcional em casos de LT não responsivos aos medicamentos convencionais.

Calvopina *et al.* (2004) e Amato *et al.* (2007) demonstraram resultados satisfatórios de seu emprego no tratamento da LMC. Outros fármacos já estudados como alternativas aos antimoniais pentavalentes no tratamento da LT foi a mefloquina, que apresentou resultados satisfatórios em pacientes do Estado do Pará e o metilfosine, que tem apresentação oral e foi administrada no tratamento de pacientes do Iran acometidos por *L. major* (Pinheiro *et al.*, 2002, Mohebbali *et al.*, 2007).

Tentando evitar os vários problemas associados à quimioterapia, investiram-se esforços para melhorar o tratamento de pacientes que já têm leishmaniose tegumentar, com o desenvolvimento da vacina Leishvacin®. Esta vacina é um recurso terapêutico, mas várias tentativas buscam avaliar a possibilidade de usá-la como vacina profilática, só ou associada com outros adjuvantes (Genaro *et al.*, 1996; Garcez *et al.*, 2002).

1.8 MEDIDAS DE CONTROLE

Em virtude das características epidemiológicas peculiares da LT, as estratégias de controle recomendadas pelo Ministério da Saúde devem ser flexíveis, distintas e adequadas a cada região ou foco particular. Recomendam-se medidas de proteção individual, atividades educativas e um trabalho em conjunto de todos os órgãos gestores da saúde, com o envolvimento de equipes multiprofissionais.

Considerando o polimorfismo genético e a diversidade biológica dos parasitos, o desenvolvimento de vacinas é uma tarefa difícil. Até tais vacinas estarem disponíveis, medidas mais convencionais, como controle do vetor, do reservatório e constante vigilância epidemiológica continuam sendo as melhores opções para prevenção e retenção da doença (Grimaldi & Tesh, 1993; FUNASA, 2007).

O interesse da Alcoa/Omnia Minérios Ltda. no conhecimento das condições de saúde prevalentes na área de influência da mineração de bauxita do município de Juruti, Pará, e a perspectiva de desenvolvimento microrregional, propiciam a realização de diversas pesquisas. Entre elas coube-nos o estudo da epidemiologia da LT e dos insetos transmissores da doença.

1.9 OBJETIVOS

1.9.1 Geral

Elucidar os aspectos epidemiológicos relevantes para o controle da leishmaniose tegumentar no município de Juruti, Estado do Pará, considerando o crescimento populacional e as atividades de mineração.

1.9.2 Específicos

- a) Descrever a frequência de novos casos de LT (casos incidentes) ao longo de 12 meses, entre atendimentos realizados no hospital municipal de Juruti;
- b) Proceder ao diagnóstico etiológico, após consentimento do sujeito da pesquisa;
- c) Comparar a sensibilidade de métodos de diagnóstico parasitológico e molecular;
- d) Investigar a ocorrência de insetos vetores de LT humana em áreas de atividade da mineradora;
- f) Discutir a relevância dos achados e suas implicações na prevenção e controle da LT em Juruti.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Evandro Chagas (IEC) sob o protocolo CEP/IEC – N° 0029/07, conforme apresentado no Anexo A.

2.1 DESENHO DO ESTUDO

O delineamento deste estudo abrange duas linhas de ação para elucidar aspectos epidemiológicos da LT em Juruti:

a) Etiologia dos casos incidentes

Considerou-se o universo de indivíduos que compõem a demanda espontânea do único Hospital Municipal, chamado Francisco Barros, onde a frequência dos casos incidentes de LT foi acompanhada ao longo de um ano. A investigação de cada caso incluiu o isolamento de *Leishmania* e/ou identificação da espécie, diretamente do fragmento de pele da borda da lesão, pela PCR.

b) Identificação de espécies vetoras

Realizou-se um estudo entomológico para identificação das espécies de flebótomos existentes no município de Juruti e que são vetoras de LT a humanos.

c) Oficinas de trabalho com profissionais de saúde do município de Juruti, Pará

Durante o desenvolvimento da pesquisa foi ministrado um curso teórico/prático aos profissionais de nível médio sobre o diagnóstico laboratorial das leishmanioses e outro sobre diagnóstico e tratamentos das leishmanioses aos profissionais de nível superior SEMSA de Juruti e funcionários da equipe médica da mineradora. Esse curso foi ministrado pela equipe do IEC, 9° Centro Regional de Saúde

localizado no município de Santarém, Pará e dois professores da Universidade de São Paulo: Dra. Hiro Goto e o Dr. José Ângelo Lautella Lindoso.

2.2 CARACTERÍSTICAS DO MUNICÍPIO E DA ÁREA DE ESTUDO

O município de Juruti pertence à Mesorregião do Baixo Amazonas e Microrregião de Óbidos. Localiza-se no oeste do Pará, às margens do rio Amazonas, e tem como limites: ao norte Oriximiná e Óbidos, a leste Óbidos e Santarém, ao sul Aveiro, a oeste o Estado do Amazonas e Faro. A sede municipal tem as seguintes coordenadas geográficas: 02°09'09''S e 56° 05'42''W Gr. A população, no ano de 2004, de acordo com o Departamento de Informática do SUS (DATASUS/MS), era de 34.415 habitantes, sendo a maioria da área rural (22.542), onde se distribuem em 178 comunidades registradas na Prefeitura. A área rural tem características próprias e diversidade fisiográfica reunidas no mesmo espaço, com diferentes aspectos da região Amazônica: várzea, região de rios e planaltos.

Em 2008, a população atual de Juruti é de 48.000 pessoas (informação verbal)¹. Cinquenta e sete por cento (57%) da população economicamente ativa (indivíduos acima de 10 anos de idade), segundo o IBGE 2005 ocupam-se de atividade como agricultura, pecuária, exploração florestal e pesca (PARÁ, 2006).

2.3 ABORDAGEM DOS SUJEITOS DA PESQUISA

Foram investigados indivíduos que apresentaram lesões suspeitas para LT atendidos no Hospital Municipal Francisco Barros no período de fevereiro de 2007 a fevereiro de 2008.

¹ Informação fornecida pela Secretaria Municipal de Saúde de Juruti

Os pacientes foram submetidos a um questionário contendo dados pessoais, epidemiológicos e clínicos, de acordo com o Anexo B, participando do estudo aqueles que consentiram por meio da assinatura do “termo de consentimento livre e esclarecido” (Anexo C). O fluxo de atendimento, coleta e diagnóstico estão demonstrados na Figura 3.

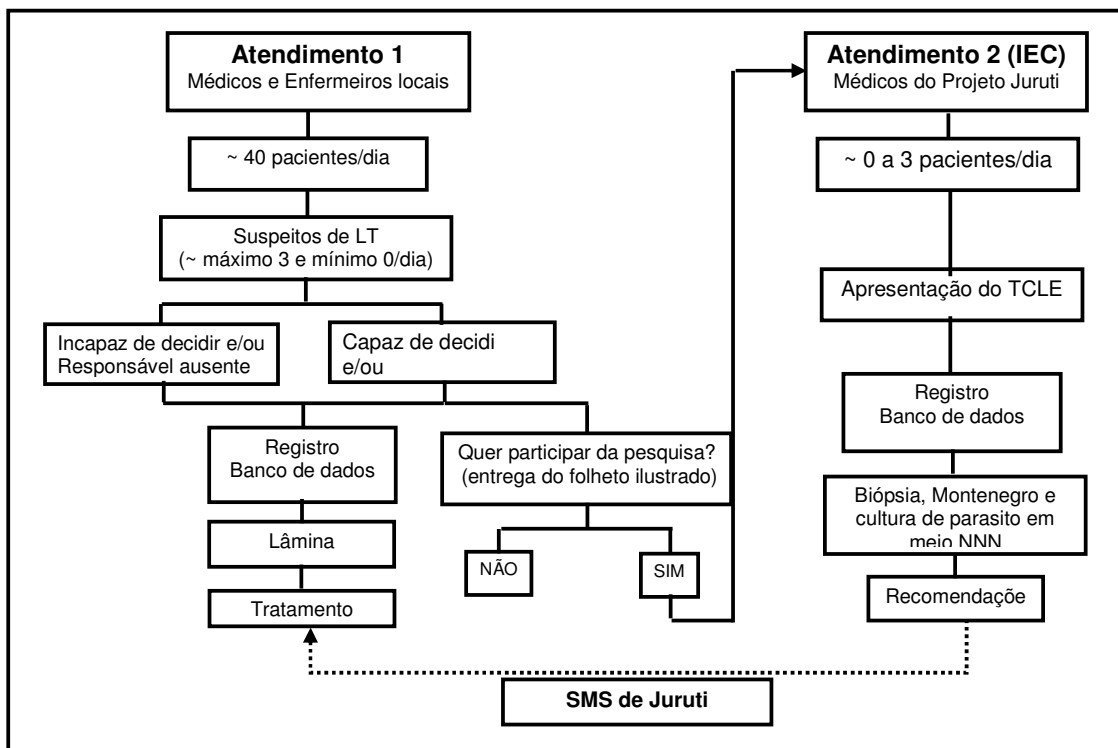


Figura 3 – Fluxograma para atendimento e abordagem dos sujeitos da pesquisa no Hospital Municipal Francisco Barros, município de Juruti.

O trabalho contou com o apoio da equipe médica da SEMSA de Juruti, que realizou as biópsias de pele de fevereiro/2007 a julho/2007 e as encaminhou ao IEC. Contudo, em três pontos ao longo do período a coleta foi realizada com apoio da equipe do IEC, que incluiu uma médica e a participação da mestranda.

Nos três períodos em que a equipe do IEC esteve no município, o fragmento de pele foi dividido e metade foi destinada à tentativa de isolamento do parasito em meio de cultura NNN e posterior criopreservação.

Espécimes coletados pelos profissionais da SEMSA - Jututi foram conservados em NET (0,15 mM de NaCl, 50 mM de EDTA, 0,1 M, Tris-HCl [pH 7,5]) e enviados ao laboratório do IEC para o diagnóstico molecular pela PCR.

2.4 COLETA DE MATERIAL

2.4.1 Assepsia da lesão

Após assepsia da lesão com água e sabão neutro, o tecido necrosado era raspado com lâmina de bisturi estéril para limpeza da lesão e a desinfecção era feita com solução de iodopolvidine.

2.4.2 Escarificação da borda da lesão

A borda da lesão era escarificada com lâmina de bisturi nº 15 estéril. Com o material obtido preparava-se esfregaço circular em três lâminas de vidro devidamente identificadas, para a realização do exame parasitológico direto. Após coleta, os pacientes recebiam curativo e aguardavam o resultado do exame. Os casos de leishmaniose tegumentar foram tratados pelos médicos da SEMSA - Juruti.

2.4.3 Biópsia de pele

A biópsia foi realizada com *punch* de 3 mm, descartável e estéril, em área da borda da lesão escolhida, previamente anestesiada com cloridrato de lidocaína a 2% sem vasoconstritor. O fragmento era conservado em 0,5mL de solução NET e mantido sob refrigeração a 4°C até ser encaminhado ao IEC pela SEMSA - Juruti.

2.5 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

2.5.1 Exame Parasitológico Direto

O material escarificado da borda da lesão era fixado na lâmina com álcool metílico por 2 a 3 minutos e em seguida cobria-se a lâmina com o corante Giesma (1 gota do corante: 1mL de água tamponada) por 60'. Em seguida o excesso de corante era retirado com jatos de água tamponada. Após secagem, observava-se ao microscópio com objetiva de imersão (100x) a presença ou ausência de amastigotas (Figura 4).

2.5.2 Teste Intradérmico de Montenegro

Foi realizado com injeção de 0,1 mL do antígeno de Montenegro na face ventral do antebraço. Após 48 horas, o local era examinado e a presença de endureção medida com ajuda de um paquímetro, considerando o resultado positivo quando a área fosse superior ou igual a 5 mm (Figura 5).

2.5.3 Isolamento de *Leishmania*

Nos três períodos, de duas semanas cada, o material da biópsia da borda da lesão era imerso em solução salina com antibiótico (penicilina/estreptomicina [1000U/200µg]) por 5'. Em seguida, a biópsia de pele era fracionada. Um dos fragmentos era semeado em meio de cultura NNN em condições assépticas e o outro conservado em solução NET e destinado à PCR. Os tubos de cultura permaneciam à temperatura ambiente e o crescimento das formas promastigotas verificado semanalmente, por 28 dias.

2.5.4 PCR em amostra de pele

Para os testes moleculares utilizou-se o DNA extraído da borda da lesão, conservado em solução NET. As sondas consistiam em oligonucleotídeos baseados nos

genes da subunidade menor do DNA do ribossomo (SSUrDNA) e da enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD) de *Leishmania* que, em conjunto, discriminam gênero, subgêneros (*Leishmania* e *Viannia*) e algumas espécies, como *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (Savani *et al.*, 2004; Castilho *et al.*, 2003).

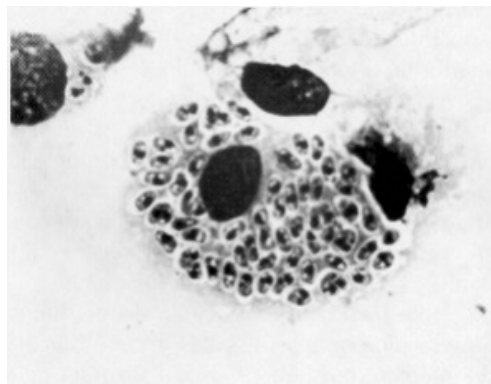


Figura 4 – Formas amastigotas intracitoplasmática (Fonte: Silveira *et al.*, 1997)

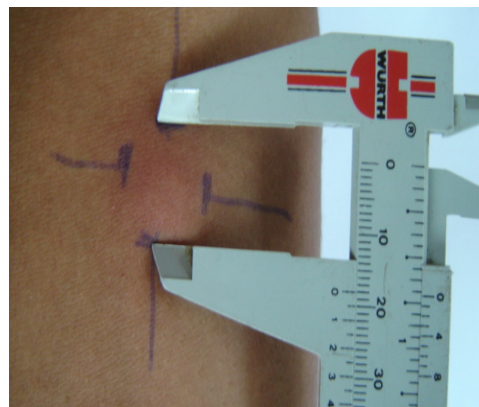


Figura 5 – Aferição da enduração no antebraço após realização do Teste de Montenegro. Fonte: própria

2.6 MÉTODOS MOLECULARES

2.6.1 Extração de DNA do fragmento de pele

A biópsia preservada em NET à temperatura de 4°C era lavada três vezes com 500 µL de solução salina tamponada com fosfato-PBS 1X (Na₂HPO₄ 7 mM, NaH₂PO₄ 26 mM, NaCl 130 mM [pH- 7,2]) e centrifugada por cinco minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante era descartado e outros 200 µL da mesma solução eram adicionados para macerar a biópsia com ajuda de pistilo e vórtex. Em seguida adicionavam-se 20 µL de solução de duodecil sulfato de sódio a 1% (SDS) e 1µL de proteinase K a 20mg/mL, para incubação por 12 horas em banho-maria a 42°C. Após esse período, 200µL de fenol saturado eram acrescentados e centrifugados a 12.000 rpm por 12 minutos para recuperação da fase aquosa. Adicionavam-se à fase aquosa 100µL da solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24: 24: 1) com mais uma centrifugação de 5 minutos a 12.000 rpm. A fase aquosa obtida após a centrifugação era recuperada, acrescentando-se 200 µL de clorofórmio para centrifugação de 5 minutos a 12.000 rpm. A fase aquosa obtida era precipitada com solução de acetato de sódio a 3M, pH 7,0 e 400µL de etanol absoluto gelado (-20°C) após centrifugação de 10 minutos a 12.000 rpm (Uliana *et al.*, 1991). O sobrenadante era desprezado e 500µL de solução de álcool a 70% eram acrescentados para retirada do excesso do sal formado e hidratação da fita de DNA, com centrifugação por 5 minutos a 12.000 rpm. Esta etapa era repetida por mais uma vez e em seguida o tubo era colocado em estufa a 37°C por 30 minutos, para total evaporação do álcool. O DNA extraído era ressuspensão com 50µL de água destilada estéril e armazenado em geladeira a 4°C.

2.6.2 PCR ribossômico

O método para a discriminação da espécie de *Leishmania* é baseado na seqüência de bases nitrogenadas conservadas da região menor da subunidade do DNA ribossomal (SSUrDNA) descrita por Savani *et al.*, (2004). Inicialmente a PCR identifica a família Trypanosomatidae e posteriormente o produto da reação é utilizado para o ensaio do *Nested-PCR* para identificar o gênero *Leishmania*. O produto obtido dessa reação é ligado a vetor específico, para multiplicação do número de cópias de DNA, e submetido à reação de seqüenciamento para a identificação do subgênero e, possivelmente, da espécie.

O ensaio da PCR executado para pesquisa do SSUrDNA emprega Taq DNA polimerase 0,02 U/ μ L, solução de MgCl₂ a 2,0 mM, dNTPS a 0,2 Mm de cada, solução tampão 1x com cloreto de potássio (Invitrogen, catálogo 10966-030), sondas S4 (5' GAT CCA GCT GCA GGT TCA CC 3') e S12 (5' GGT TGA TTC CGT CAA CGG AC3'), S17 (5' CCA AGC TGC CCA GTA GAA T 3') e S18 (5' TCG GGC GGA TAA AAC ACC 3') a uma concentração de 0,2 mM cada, 2,0 μ L de amostra e o volume da reação completado para 50 μ L com água. A reação era processada em termociclador master cycler gradiente eppendorf, com temperatura de desnaturação de 94°C por 5 minutos, seguindo-se 30 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, anelamento de 1 minuto a 55°C, temperatura de extensão de 72°C por 45 segundos. A extensão final era de 10 minutos a 72°C. Utilizou-se como controle positivo para os ensaios, 50ng/ μ L de DNA gênomico extraído da cepa de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* com registro no criobanco da Organização Mundial de Saúde de MCER/BR /1981/M6445. O produto da PCR gerou fragmentos de 520 pares de bases que eram visualizados por eletroforese em gel de agarose.

2.6.3 PCR G6PD

Amostras com resultado positivo no PCR ribossômico eram submetidas aos ensaios que tinham como alvo o *locus* da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD). O padrão polimórfico revelado por caracterização parcial do gene que codifica a enzima G6PD gera marcadores moleculares úteis na identificação de espécies de *Leishmania*. As sondas ISVA-ISVC (5' GTC GGT TAT CCT ATT CGG GTC 3' - 5' ATC ACA ATG ATG GTCAACGCAC3') eram utilizadas para distinguir organismos do subgênero *Leishmania* (*Viannia*), as sondas ISVC-ISVG para espécies do subgênero *Leishmania* (*Viannia*) *não braziliensis* (5' ATC ACA ATG ATG GTCAACGCAC3' - 5' TAC TCG CCA TGT CGT CG 3') e as sondas ISVC-ISVB (5' ATC ACA ATG ATG GTCAACGCAC3' - 5' TAC TCG CCA TGT CGG AGG A 3') para a espécie *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (Castilho *et al.*, 2003).

O ensaio da PCR empregou Taq DNA polimerase 0,02 U/ μ L, solução de MgCl₂ a 2,0 mM, dNTPS a 0,2 Mm de cada, solução tampão 1x com cloreto de potássio da (Invitrogen, catalogo 10966-030), 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e sondas de ISVA-ISVC a uma concentração 0,2 mM cada, 2,0 μ L de amostra e o volume da reação completado para 50 μ L com água. A reação era processada em termociclador master cycler gradiente eppendorf, com temperatura de desnaturação de 94°C por 5 minutos, seguindo-se 30 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, anelamento de 1 minuto a 60°C, temperatura de extensão de 72°C por 45 segundos. A extensão final era de 10 minutos a 72°C. Utilizou-se como controle positivo para os ensaios 50ng/ μ L de DNA gênomico extraído da cepa de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147) e controles negativos *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*

chagasi (MCER/BR /1981/M6445) e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269). Essa reação gera um produto de 333 pares de bases.

Em seguida esse produto foi utilizado para duas reações de Semi-Nested PCR com as sondas ISVC-ISVG e ISVC-ISVB separadamente, mas nas mesmas condições do ensaio da PCR acima citado. A temperatura de desnaturação foi de 94°C por 5 minutos, seguindo-se 30 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, anelamento de 1 minuto a 68°C para as sondas ISVC – ISVG e de 67°C para as sondas ISVC-ISVB, temperatura de extensão de 72°C por 45 segundos. A extensão final foi de 10 minutos a 72°C. O produto da PCR gerou fragmentos de 238 e 234 pares de bases para as sondas ISVC-ISVG e ISVC-ISVB, respectivamente, que eram visualizados por eletroforese em gel de agarose.

2.6.4 Eletroforese em Gel de Agarose

Para separação dos fragmentos em campo elétrico era feito um gel de agarose de relação massa/volume de 1,5% em TAE 1x (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM), com brometo de etídio (10µg/ml). O gel submerso em TAE 1x era submetido a uma diferença de potencial de 100V/cm. Eram adicionados 2,0µL de volume de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, Ficoll 400 15% em água) aos produtos de PCR, antes de aplicá-las ao gel. As bandas de DNA eram visualizadas sob luz UV de 260nm e registradas em câmera digital

2.7 CLONAGEM

As técnicas utilizadas para clonagem, como o preparo de bactérias competentes, reação de transformação através da ligação do produto da PCR ao vetor,

plaqueamento e seleção de colônias para a extração de DNA plasmidial, foram baseadas em protocolos descritos por Hanahan *et al.* (2002) e Sambrook *et al.* (2001).

2.7.1 Preparo de Bactérias Competentes

Uma colônia de *Escherichia coli*, cepa DH5 α era inoculada em 3mL de meio SOB (triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10 mM) mantida a 37°C por 12 horas sob agitação em estufa tipo skaker (Thermo Elétron Corporation). O inóculo de 3mL era colocado em frasco com 100mL de meio SOB por 20 minutos a 37°C sob agitação para crescimento verificado em espectrofotometro (Gene Quant pro fabricante) a cada 20 minutos na densidade óptica (DO) de 550n – 600n até atingir DO igual a 0,5. A seguir as bactérias eram colhidas por centrifugação a 4°C a 2000 rpm por 12 minutos. O sobrenadante era descartado e o precipitado lavado com 33 mL de soro bovino fetal (SBF) no vórtex, permanecendo por 10 minutos em banho de gelo. As bactérias eram novamente colhidas por centrifugação e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 8 mL de SBF e 280 μ L de DMSO em banho de gelo por 10 minutos. Alíquotas de 200 μ l foram separadas em tubos de criopreservação e armazenadas em nitrogênio.

2.7.2 Ligação do produto do PCR ribossômico ao vetor

A reação de ligação do produto do PCR ribossômico utilizou 0,5 μ L do vetor TA Cloning® pCR® 2.1 (25ng/ μ L) da Invitrogen catálogo K2020-20, 5,0 μ L de solução tampão 2X, 3,5 μ L de água destilada estéril, 0,5 μ L do produto da PCR ribossômico e 0,5 μ L da enzima ligase. A reação era incubada em estufa a 25°C por uma hora.

2.7.3 Transformação

Foram adicionados 10µL da reação de ligação do produto da PCR ribossômico ao vetor TA Cloning® pCR® 2.1 no tubo de criopreservação contendo 200µL de bactérias competentes. Após a ligação, o frasco era colocado em banho-maria a 42°C por 90 segundos e em seguida, colocado em banho de gelo. Eram adicionados 800 µL de meio SOB e incubado por 45 minutos a 37°C em estufa tipo shaker. As bactérias transformadas eram plaqueadas em placa de petri com meio SOB-AIX (ampicilina-100mg/mL; IPTG 200mg/mL [Fermentas R0392]; X-GAL 200mg/mL [Fermentas R0402]) e incubada por 12 horas em estufa a 37°C. Após esse período as placas eram retiradas e armazenadas na geladeira a 4°C.

2.7.4 Seleção de Bactérias e Extração de DNA de plasmídeo em pequena escala - mini-prep

Uma colônia de bactéria transformada (colônia de cor branca) era inoculada em 3mL de meio SOB com 100µg/mL de ampicilina e mantida por 18h a 37 °C sob agitação. A cultura era centrifugada por poucos segundos a 12.500 rpm, à temperatura ambiente (TA), e as células eram ressuspensas com 300µl de solução P1 (Tris/HCl 50mM, EDTA 10mM, RNase 100µg/ml). Adicionavam-se 300 µl de solução P2 (NaOH 200mM, SDS 1%), homogenizando a mistura por inversão depois incubava por 5 minutos à TA. Foram adicionados 300µl de solução P3 (acetato de potássio 5M pH 5,5) realizando homogenização por inversã deixando em repouso por 5 minutos em TA. Os restos celulares eram centrifugados a 12.500 rpm por 15 minutos a 4°C. Ao sobrenadante eram adicionados 600µL de álcool isoamílico. A fase aquosa resultante desta extração era precipitada com 1mL de etanol a 70% gelado. Após centrifugação a

12.500 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante era descartado e o precipitado seco em estufa a 37°C. O precipitado era finalmente ressuspensão em 50µL de solução TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 0,1M pH 5,5).

2.7.5 Clivagem do DNA Plasmidial com Enzima de Restrição

As clivagens de DNA eram feitas com 1µL da enzima de restrição Eco RI (Fermentas ER0271), 2,0µL da solução tampão da enzima, 3,0µL de mini-prepi e volume final completado com água para 10µL. A reação era incubada por uma hora em estufa a 37°C. Após a incubação era feita eletroforese em gel de agarose a 1,5% das amostras digeridas com Eco RI e as não digeridas para verificar a liberação do fragmento do vetor.

2.8 REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO

A reação de seqüenciamento seguiu protocolo de acordo com o “kit” ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystem), nas condições descritas pelo fabricante. Foram utilizados 6,0 µl de solução tampão *save money*, 3,0 µl do oligo T7, 2,0 µl da solução *big dye*, 1,0 µl de mini-prepi no volume final de 20 µl. A reação era processada em termociclador master cycler gradiente eppendorf na temperatura inicial de 96°C por 1 minuto e 30 segundos, 50 ciclos de 96°C por 20 segundos, anelamento por 20 segundos a 55°C e extensão final de 4 segundos a 60°C.

2.8.1 Reação de Precipitação

Cada amostra não digerida com enzima Eco RI era precipitada com 33 µL de *cocktail* de precipitação (550µL de etanol gelado, 22µL de solução de acetato de sódio a 3M pH 5.2, 22 µL de glicogênio a1mg/mL), agitada no vórtex e incubada em

banho de gelo por 15 minutos em TA. Descartava-se o sobrenadante e eram acrescentados 50 μ L de solução de etanol a 70% gelado. Em seguida centrifugava-se a 14.000 rpm por 30 minutos em TA. O sobrenadante era descartado e o precipitado seco protegido da luz. Após essa etapa o frasco era encaminhado para o serviço de seqüenciamento de DNA do Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo, que utilizava seqüenciador ABI 3100 Genetic analyser da Applied Biosystems, fabricado pela HITACHI. As sequências de nucleotídeos foram analisadas utilizando o programa BioEdit.

2.9 PESQUISA ENTOMOLÓGICA

2.9.1 Seleção das áreas de coleta

As coletas entomológicas foram realizadas em áreas de mata primária e mata secundária próximas á área de beneficiamento de bauxita no município de Juruti, Pará.

2.9.2 Método de captura

O método de coleta empregado foi armadilha tipo Shannon (Figura 6). A armadilha era instalada na mata para capturas nos horários de 18h às 20h. Dados como temperatura, umidade relativa do ar, pressão atmosférica e índice pluviométrico eram observados no momento das coletas. Os pontos selecionados para as coletas entomológicas foram registrados por GPS.

2.9.3 Identificação entomológica

Os flebotomíneos coletados eram encaminhados para o laboratório, onde eram separados por sexo, com base na morfologia externa. Os machos eram conservados em álcool a 70%, para posterior montagem entre lâmina e lamínula com

líquido de Berlese. Após clarificação, eram identificados utilizando a extensa literatura concernente e tomando como base a classificação adotada por Young & Duncan (1994). As fêmeas eram dissecadas ainda frescas, pouco tempo após a coleta, ao microscópio estereoscópico, em algumas gotas de solução salina sobre lâmina de microscopia, com vistas ao achado de infecção natural por promastigotas de *Leishmania*. Posteriormente também eram montadas em lâminas, para identificação taxonômica, de acordo com a forma das espermatecas e do cibário os mais importantes caracteres para identificação das espécies. Na presença de infecção natural, os promastigotas eram aspirados por pipeta ou seringa hipodérmica descartável e transferidos para tubos de ensaio contendo meio NNN, para tentativa de isolamento de *Leishmania*.



Figura 6 – Captura de flebotomíneos utilizando armadilha tipo Shannon no município de Juriti, Pará.

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através de testes estatísticos, utilizando o programa Excel e registrados em banco de dados criado em D'BASE 3.0 que

permitiram o cálculo de médias, desvios e frequências, considerando as informações coletadas na ficha preliminar de inquérito.

Foram feitas ainda outras análises: a) da prevalência dos casos de LT nos três pontos de investigação; b) dos casos incidentes baseados nas prevalências calculadas.

3 RESULTADOS

3.1 CASOS INCIDENTES NO HOSPITAL FRANCISCO BARROS, JURUTI, PARÁ

No período de janeiro a dezembro de 2007 foram atendidos no Hospital Municipal Francisco Barros 77 pacientes com lesões suspeitas de LT. O diagnóstico foi realizado pelo exame de escarificação da borda das lesões, sendo confirmado pela demonstração do parasito em 54,5% (42/77) após coloração pelo método de Giemsa. A Figura 8 demonstra a distribuição mensal dos casos parasitologicamente confirmados de LT.

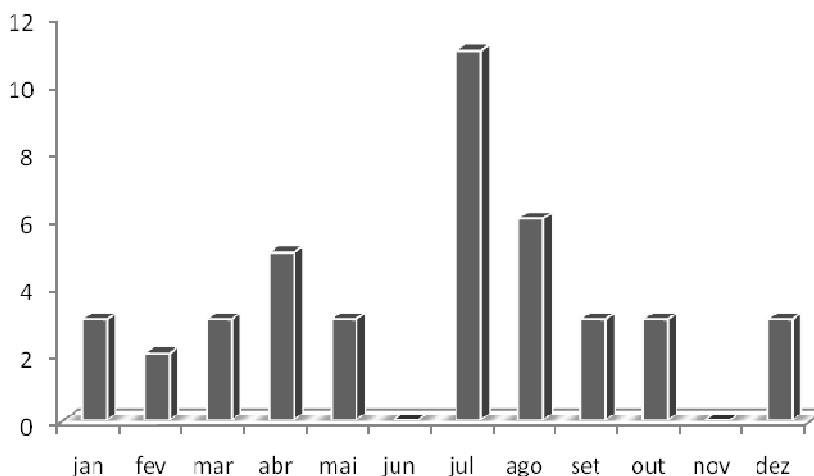


Figura 7 – Distribuição sazonal dos casos incidentes de LT notificados com confirmação parasitológica no Hospital Francisco Barros, município de Juruti, no período de janeiro a dezembro/2007. Fonte: Secretaria Municipal de Saúde de Juruti, Pará.

3.1.1 Perfil clínico-epidemiológicos dos casos incidentes

Dos 42 pacientes com LT atendidos de janeiro a dezembro de 2007 pela SEMSA de Juruti, foram solicitadas informações para elucidar o perfil das pessoas expostas ao risco de contrair a doença. A maioria residia na zona rural (33/42, 79%), predominaram os casos masculinos (41/42, 98%) sobre os femininos (1/42, 2%). Quando perguntada a ocupação dessas pessoas constatou-se que 67% (28/42) exerciam

atividades de risco como, por exemplo, a caça, a pesca, a agricultura, a mineração; outros 29% (12/42) eram trabalhadores efetivos de empresas envolvidas com a exploração de bauxita (Tabela 1). As lesões eram únicas em 79% (33/42) e localizavam-se nos membros inferiores em 69% dos indivíduos. Apenas em 27% (11/42) dos casos confirmados de LT a busca pelo serviço ocorreu em menos de um mês de doença.

Tabela 1 – Perfil epidemiológico dos casos incidentes de leishmaniose tegumentar atendidos no Hospital Municipal Francisco Barros, Juruti, Pará, de janeiro a dezembro de 2007

Nº	Sexo		Faixa etária			Moradia		Ocupação de risco		Efetivos de empresas	
	M	F	<10	10-20	20-40	rural	urbana	Sim	Não	Sim	Não
42	41 98%	1 2%	13 31%	24 57%	5 12%	33 79%	9 21%	28 67%	14 33%	12 29%	30 71%

Fonte: Laboratório de Endemias da Secretaria Municipal de Saúde de Juruti.

3.1.2 Procedência dos pacientes com LT

Dentre os 42 casos confirmados de LT apenas dois eram importados de outros municípios (Mojú dos Campos, estado do Pará e Laranjal do Jari, estado do Amapá). Os demais casos pertenciam a vinte comunidades rurais do município de Juruti. As comunidades de Santo Hilário, Jabuti, Cipó e o Aeroporto do município estão próximas às construções da rodovia PA-182 e da ferrovia que são vias de acesso das instalações da empresa ao porto e à cidade de Juruti. As comunidades de Socó, Cpiranga, Jauari e Galiléia estão próximas à área de extração e beneficiamento de bauxita. As comunidades de Santa Maria, Paraíso e São Paulo estão localizadas no perímetro urbano próximo à sede do município. Dentre as demais localidades, a comunidade de São Francisco do Aruã se destacou por registrar 5 novos casos de LT. A Tabela 2 mostra a distribuição dos casos confirmados de LT em Juruti.

Tabela 2 – Número de casos e localização das comunidades onde residem os pacientes com diagnóstico laboratorial positivo para LT, atendidos no Hospital Municipal Francisco Barros, Juruti, Pará em 2007

Localização das Comunidades	Nº de casos de LT	%
Rodo – ferrovia (Santo Hilário, Jabuti, Cipó, Aeroporto)	8	19
Área de mineração (Socó, Capiranga, Jauari, Galiléia)	11	26
Periurbanas (Santa Maria, Paraíso, São Paulo)	4	10
Outras localidades (Ferrugem, Capelinha, São Benedito, Araçã Preto, São Francisco do Aruã, Bem Longe, Bom Jardim, Piraquara, Soledade, Mojuí dos Campos (PA), Laranjal do Jari (AP).	19	45
Total	42	100

Fonte: Laboratório de Endemias da Secretaria Municipal de Saúde de Juruti.

3.2 ATENDIMENTO DOS CASOS SUSPEITOS DE LT NOS PONTOS DE COLETA

As investigações do IEC tiveram início no mês de fevereiro de 2007, quando se registraram, ao longo de duas semanas, três pacientes com lesão suspeita. Nas viagens seguintes, julho de 2007, registraram-se oito pacientes com mesma suspeita de e no terceiro ponto de coleta, no mês de novembro de 2007, não houve atendimento de casos semelhantes. A Tabela 3 refere o número de casos suspeitos de LT, o número de casos confirmados pelo exame direto e a etiologia de *Leishmania* esclarecida por PCR no fragmento de pele, nos três pontos de coleta.

Tabela 3 – Registro de casos suspeitos, casos confirmados ao exame direto e etiologia nos atendimentos realizados nos pontos de coletas no Hospital Francisco Barros, Juruti, Pará, 2007

Meses	Suspeitos	Confirmados	Etiologia
Fevereiro	3	1	<i>L. (Viannia) sp</i> (1)
Julho	8	3	<i>L. (Viannia)sp</i> (1) <i>L. (V.)braziliensis</i> (2)
Novembro	0	0	-

3.3 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONAIS COM A PCR

Além das 11 amostras obtidas nos pontos de coleta, o laboratório responsável pelo diagnóstico molecular de LT no IEC recebeu outras 10 amostras de pele obtidas diretamente da lesão de pessoas com suspeita da doença enviadas pela equipe da SEMSA de Juruti. Essa equipe também foi responsável pelo envio dos dados clínico-epidemiológicos, das lâminas para revisão do exame parasitológico direto e do resultado da reação intradérmica de Montenegro (RIM). A Tabela 4 mostra a comparação dos resultados obtidos dos exames laboratoriais convencionais, como o exame direto, a reação intradérmica de Montenegro, a cultura em meio NNN realizada apenas nos pontos de coleta, e das técnicas moleculares.

Tabela 4 – Leishmaniose tegumentar em pacientes atendidos no Hospital Municipal Francisco Barros, Juruti, Pará, no período de fevereiro a julho de 2007. Comparação da positividade dos métodos de diagnóstico convencionais e PCR

Métodos diagnósticos	Testados	Positivos	%
Exame direto	21	11	52
RIM	20	12	60
Exame direto + RIM	20	8	40
Cultura	11*	3	27
<i>Leishmania (V.) sp.</i>	21	12	57
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	12	9	75

*Três tubos de cultura contaminaram no campo.

A análise molecular dos 21 casos suspeitos de LT identificou 12 positivos para o gênero *Leishmania* (57%), sendo 11 (52%) parasitologicamente confirmados. A maioria das amostras positivas gerou produtos de PCR espécie-específicos (9/12, 75%) para *L. (V.) braziliensis*, enquanto as demais (3/12, 25%) não apresentaram resultados positivos para o subgênero *Viannia* e nem para a espécie *L. (V.) braziliensis* pela PCR G6PD, mas a etiologia da doença foi esclarecida, após clonagem e seqüenciamento, como sendo *L. (Viannia)* nas três amostras.

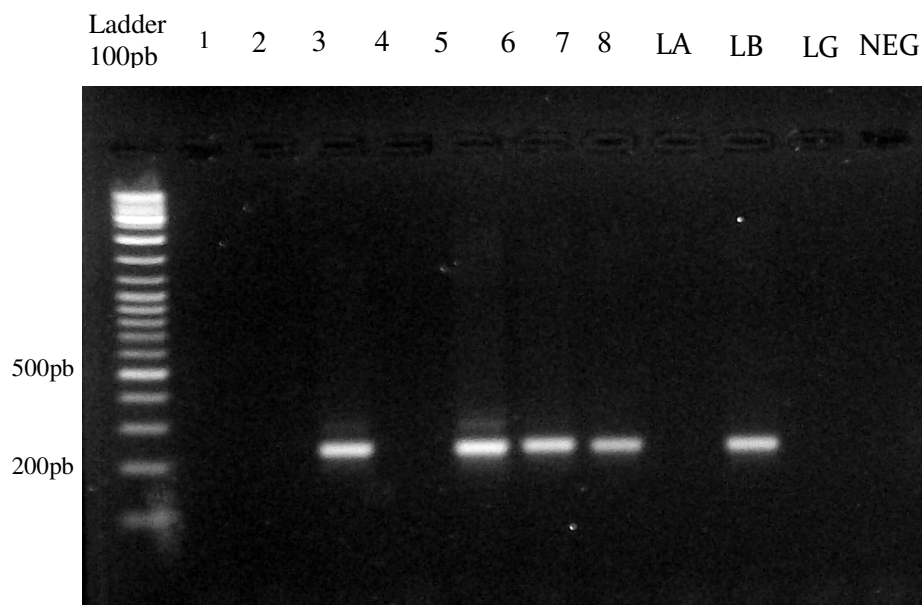


Figura 8 – Produtos de PCR revelados em gel de agarose (1,5%). O comprimento do produto de PCR específico para *L. (V.) braziliensis* é de 234bp.

3.3.1 Perfil epidemiológico dos casos de LT confirmados por PCR

As reações de Montenegro variaram de 7 a 40mm, com média de 11mm, nos pacientes com diagnóstico de *L. (Viannia) braziliensis*. Esses pacientes também buscaram atendimento no serviço de saúde em um tempo menor (1,2 meses) em relação aos pacientes com diagnóstico de *L. (Viannia)*, que foi de três meses. A localização das

lesões na maioria dos casos foi nos membros inferiores (9/12) e em nove casos a identificação do agente etiológico foi *L. (Viannia) braziliensis*, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 – Perfil epidemiológico dos casos de LT confirmados por PCR

Perfis	<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Localização das lesões		
Membros superiores	2 (2/12)	1 (1/12)
Membros inferiores	7 (7/12)	2 (2/12)
RIM (média)	11mm	16mm
Tempo de lesão (meses)	1,2	3

3.3.2 Casos prevalentes nos pontos de coleta

A prevalência para LT foi calculada com base no número de indivíduos que buscaram atendimento médico por qualquer motivo (exceto emergências) no Hospital Municipal Francisco Barros e que aceitaram participar da pesquisa. Estes representaram a demanda espontânea do Hospital nos três pontos de investigações realizadas inicialmente no período de 01 a 17/02/2007 (mês 2), a segunda de 25/06 a 06/07/2007 (mês 7) e a terceira no período de 05 a 18/11/2007 (mês 11) cujos resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Taxa de detecção de leishmaniose tegumentar entre os atendimentos realizados no Hospital Francisco Barros, Juruti, Pará, em diferentes pontos de investigação nos períodos de duas semanas cada.

Mês	Nº de Atendimentos	Suspeitos	Positivos LT	Taxa de detecção %
2	401	3	1	0,25
7	300	8	3	1,66
11	446	0	0	0
Total	1147	11	4	1,71

Fonte: Gilson Braga Monte Filho - Economista/SAMAM/SVS/MS

Nos três pontos de coleta, 1147 indivíduos aceitaram participar da pesquisa do Projeto “Saúde no Município de Juruti, Pará: cenário atual, desafios e possibilidades” no qual está inserido o subprojeto Leishmanioses. Constatou-se que 20% desses atendimentos eram de indivíduos vindos de outros municípios paraenses e do Estado do Amazonas (Gilson Braga Monte Filho-Economista/SAMAM/SVS/MS).

3.4 ISOLAMENTO DE *Leishmania*

Obteve-se o isolado da biópsia da borda da lesão de dois pacientes. A análise molecular foi positiva para *Leishmania (Viannia) braziliensis* no fragmento de pele do paciente que vivia na comunidade rural de Jabuti e que buscou atendimento médico com até um mês de doença. O segundo isolado foi classificado como sendo do subgênero *Viannia*, de um homem adulto oriundo de Laranjal do Jari, Amapá, com diagnóstico parasitológico da doença feito em Oriximiná, Pará. Esses isolados estão criopreservados no criobanco do IEC e aguardam confirmação taxonômica pela técnica de anticorpos monoclonais.

3.5 FLEBOTOMÍNEOS EM ÁREA DE IMPACTO DA MINERADORA

Realizaram-se duas coletas entomológicas em janeiro de 2008, com armadilha Shannon nos arredores da Base Capiroanga, onde se concentram as instalações da empresa Alcoa. Uma coleta foi realizada em mata primária, na altitude de 156 metros, e outra em mata secundária, a 64 metros de altitude, como ilustra a Figura 9.

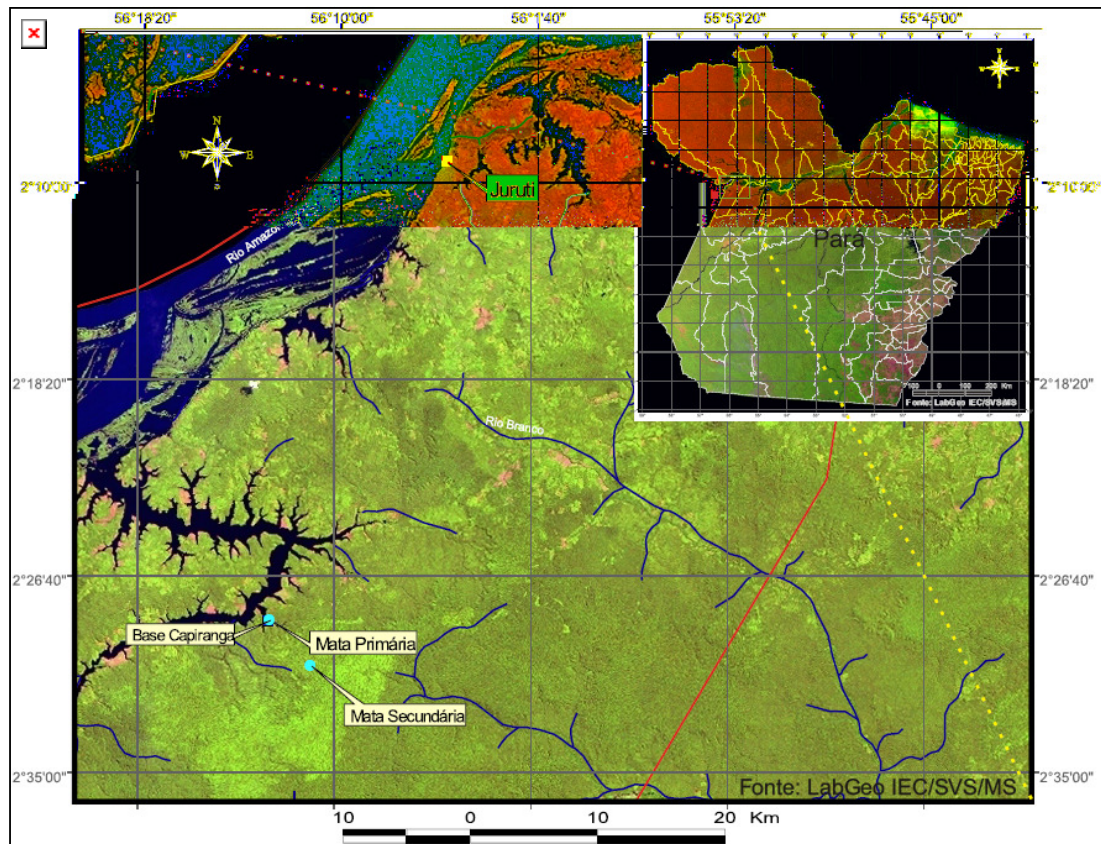


Figura 9 – Imagem de satélite destacando o município de Juruti, a base capiranga e as áreas de coleta entomológica. Fonte: Laboratório de Geoprocessamento do Instituto Evandro Chagas

Doze espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* França, 1924 foram capturados e identificadas na área de impacto da mineradora. Dos 105 flebotomíneos capturados, 88 (84%) eram fêmeas e 17 machos (16%). A Tabela 7 mostra o percentual de cada espécie encontrada e a distribuição dos insetos capturados em mata primária e mata secundária.

Tabela 7 – Flebotomíneos capturados na área de impacto da mineradora.

Espécies	Mata secundária		Mata primária		Total	%
	♀	♂	♀	♂		
<i>Lu. flaviscutellata</i>	3	1	9	1	14	13
<i>Lu. richardwardi</i>	1	-	2	1	4	4
<i>Lu. amazonensis</i>	-	-	3	3	6	6
<i>Lu. carrerai carrerai</i>	-	1	-	-	1	1
<i>Lu. chagasi</i>	-	-	5	-	5	5
<i>Lu. davisii</i>	-	-	9	1	10	10
<i>Lu. geniculata</i>	8	-	12	3	23	22
<i>Lu. llanosmartinsi</i>	-	-	1	-	1	1
<i>Lu. paraensis</i>	13	4	4	-	21	20
<i>Lu. longispina</i>	-	-	-	1	1	1
<i>Lu. complexa</i>	2	-	15	1	18	17
<i>Lu. ubiquitalis</i>	1	-	-	-	1	1
Subtotal	28	6	60	11	105	100
Total	34		71		105	100

A Figura 10 ilustra algumas das espécies vetoras mais importantes na transmissão da LT como, por exemplo, *Lu. complexa* (17%), *Lu. paraensis* (20%), *Lu. flaviscutellata* (13%) e *Lu. davisii* (10%).

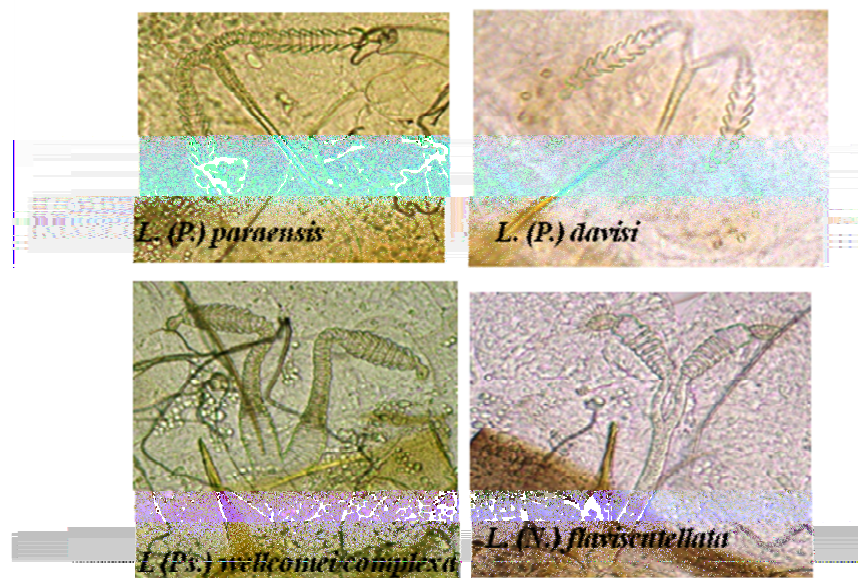


Figura 10 – Espermatecas de fêmeas de flebotomíneos capturadas na área de impacto da mineradora. Fotografias de Luís Dickson.

3.6 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LT EM JURUTI

A Tabela 8 resume os dados encontrados na pesquisa sobre a epidemiologia da LT no município de Juruti.

Tabela 8 – Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em Juruti

Fatores investigados	Resultados	%
Agente etiológico em portadores de LT	<i>L. (Viannia) braziliensis</i> ;	75
	<i>L. (Viannia) sp.</i>	25
Localização das lesões	Membros inferiores	73
	Membros superiores	27
Perfil dos casos incidentes no de 2007	Sexo masculino	98
	Moradia rural	79
	Ocupação de risco	67
	Efetivos de empresas	29
Demanda mensal dos casos de LT	Maior pico no mês de julho	26
Flebotomíneos em mata primária e secundária	<i>Lu. geniculata</i>	22
	<i>Lu. paraensis</i>	20
	<i>Lu. complexa</i>	17
	<i>Lu. davisii</i>	10
	<i>Lu. flaviscutellata</i>	13
	Outras 8 espécies	18

4 DISCUSSÃO

A LT representa um sério problema de saúde pública mundial e sua importância reside na possibilidade de evolução de feridas cutâneas localizadas às formas graves que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial. Além disso, apresenta alta incidência e ampla distribuição geográfica atingindo geralmente as populações mais carentes, especialmente aquelas que sobrevivem de atividade agrícola ou extrativista (Gontijo *et al.*, 2003).

No Estado do Pará, a incidência da LT tem se mantido elevada, sendo crescente nos últimos anos. O município de Juruti se destaca atualmente por ser cenário de grandes transformações ambientais devido a mineração de bauxita, uma das atividades do estado que mais contribui com o crescimento do PIB (Produto Interno Bruto). Durante esse estudo, homens trabalhavam na retirada da cobertura vegetal, para a construção de um porto, de uma rodo-ferrovia e da área para a prospecção do minério.

No ano de 2007 os casos incidentes de LT em Juruti somaram 42 e foram representados na sua maioria por homens (98%) que exerciam atividades de risco (67%). A maior proporção da doença no gênero masculino é ocorrência freqüente, sobretudo em áreas de mineração, como observado em Lençóis, na Bahia (Dourado *et al.*, 1989), onde 67% dos doentes eram homens adultos que trabalhavam no garimpo e na agricultura. Em Pitinga, uma vila de exploração de minério, no município de Presidente Figueiredo, estado do Amazonas, Chagas *et al.* (2006) descreveram a ocorrência de 65 casos de LT entre 2000 e 2004, com maior número para o sexo masculino (86%). Outro aspecto que chamou atenção no município de Juruti, diz respeito a prevalência da doença em crianças menores de 10 anos (31%), adolescentes e

adultos jovens menores de 20 anos (57%), o que sugere sua participação em atividades que envolvem contato com a floresta (Tab. 1).

A relação humanos-floresta é realmente decisiva para a ocorrência de LT, pois a floresta é o habitat dos mamíferos reservatórios das diversas espécies de *Leishmania* que causam a doença em humanos. Além disso, as formas imaturas das diferentes espécies de flebotomíneos vetores se desenvolvem no solo e na matéria orgânica do chão de florestas (Gomes *et al.*, 1990). Por esses motivos a LT costuma ser um dos problemas mais comuns nas frentes de trabalho (Lainson *et al.*, 1986), sobretudo pela chegada de pessoas vindas de outras localidades e que não desenvolveram, ao longo da sua vida, mecanismos de imunidade concomitante como os indivíduos residentes em área de endemia.

Demonstrou-se que 29% dos casos confirmados de LT em Juruti no ano de 2007 eram funcionários da mineradora ou de empresas prestadoras de serviços (Tabela 1). A obrigatoriedade do uso de equipamentos de proteção individual e de uniformes completos – calça, camisa de mangas compridas, óculos, protetor auricular, capacete, botas e perneiras – minimiza, mas não elimina o risco de transmissão.

Apesar dos seres humanos adquirirem LT na Amazônia ao entrarem na floresta, não se pode descartar a possibilidade de urbanização da doença, mesmo que os vetores em questão não exibam atualmente comportamento sinantrópico. A urbanização da LT é uma hipótese a se considerar principalmente onde há grande fluxo de pessoas e a retirada da cobertura vegetal. Entre os indivíduos atendidos pelo IEC no Hospital Municipal Francisco Barros 20% eram migrantes. O intenso fluxo de pessoas pode gerar ocupação desordenada ou as chamadas invasões. Alguns vetores poderiam então se adaptar aos microambientes nas periferias da cidade possibilitando a ocorrência de

surtos de LT como descrito para a comunidade São João, na cidade de Manaus (Guerra *et al.*, 2006).

Trabalhos de Guerra *et al* (2003) e Brandão-Filho *et al* (1998) descrevem a ocorrência de LT em militares dos Estados do Amazonas e do Pernambuco respectivamente e mostraram o risco de contrair a doença relacionada ao trabalho por causa da exposição aos horários de atividades do vetor. No Estado do Pará, Silveira *et al* (2002) isolou a espécie *L. (V.) lindebergi* da lesão de soldados que realizavam treinamentos na floresta.

Até o presente momento a ocorrência dos casos de LT parece constituir um evento comum em diversas áreas de floresta do município, sem ainda forte influência das atividades de mineração. É interessante notar na tabela 2 que a distribuição dos casos por local de residência é ampla na extensão territorial de Juruti. Os indivíduos que representaram os casos novos de LT em 2007 estão distribuídos em diversas comunidades dentro e fora da área de impacto direto das atividades relacionadas à mineração. Não significa dizer que o local de residência dos indivíduos portadores de LT corresponda ao local onde adquiriram a doença, mas certamente pode-se inferir que são diversas as áreas de risco na extensão territorial do município e que a transmissão se dá em um raio que abrange áreas de floresta próximas a maioria das localidades mencionadas.

A maioria dos casos de LT para os quais se realizou o diagnóstico molecular nesse estudo era devida à *L. (Viannia) braziliensis* (75%), como demonstrado na tabela 4. A espécie *L. (V.) braziliensis* está associada à transmissão por diferentes vetores e apresenta ampla distribuição geográfica ocorrendo em todos os Estados brasileiros (Grimaldi & Tesh, 1993). O vetor *Lu. complexa*, que representou 17% dos espécimes

capturados (Tab. 7), é incriminado pela transmissão dessa *Leishmania* em Paragominas, no estado do Pará. Esse vetor tem a capacidade de se adaptar ao peridomicílio e intradomicílio quando destruído o seu ecótopo natural (Lainson *et al.*, 1994; Souza *et al.*, 1996). Os vetores *Lu. (Ps.) illanosmartinsi* e *Lu. (Ps.) carrerai carrerai* também compõem a fauna antropofílica de flebotomíneos capturados nesse estudo de Juruti são incriminadas na transmissão de *L. (V.) braziliensis* (Fraiha *et al.*, 1980; Le Pont *et al.*, 1988; Le Pont & Desjeux, 1986).

Em Juruti, o maior número de casos novos de LT em 2007 foram no meio do ano (julho e agosto) como demonstra a figura 2. A sazonalidade dos casos de LT em Juruti, contudo, ainda precisa ser mais bem investigada levando-se em conta pelo menos cinco anos.

Verificou-se que as lesões cutâneas nos pacientes atendidos pela equipe do IEC (Tabela 5) localizavam-se principalmente nos membros inferiores, que a maioria das pessoas residia em localidades rurais do município de Juruti e praticava caça e pesca para garantir sua subsistência. O vôo dos flebotomíneos varia em função dos seus hábitos alimentares. Aqueles que se alimentam de animais terrestres têm vôo baixo e na hipótese de se alimentarem de sangue humano acabam por atingir membros inferiores (Brasil, 2007).

O tatu (*Dasypus novencinctus*) é o reservatório silvestre de *L. (V.) naiffii* que tem *Lu. paraensis* como vetor do parasito representou nesse estudo 20% (Tab. 7) dos espécimes capturados (Brasil, 2007). A paca (*Agouti paca*) é o possível reservatório natural de *L. (V.) lainsoni* (Brasil, 2007), transmitida aos humanos pela picada de *Lu. (T.) ubiquitalis*, flebotomíneo encontrado em baixa frequência (1%) no município de Juruti (Tab. 7). Em 25% dos casos humanos diagnosticados pelo método molecular

(PCR) foi possível se chegar ao gênero *Viannia*, mas não à espécie do protozoário (Tab. 4). Contudo, o achado dos vetores sugere que essas espécies de *Leishmania* podem contribuir à casuística de LT em Juruti.

Apesar de não se ter identificado *L. (L.) amazonensis* nos fragmentos de pele analisados, o vetor desse protozoário, *Lu. (N.) flaviscutellta*, que é pouco antropofílico, representou 10% dos flebotomíneos capturados na floresta (Tabela 7).

Vetores de importância médica estão presentes na área de impacto da mineradora, mas se faz necessário investir em estudos que venham esclarecer a diversidade de espécies, sua sazonalidade e frequência para conhecer quais as implicações da relação flebotomíneos/doença na epidemiologia da LT em Juruti. Informações sobre sazonalidade e horários de atividade do vetor são fundamentais para o controle da transmissão do parasito aos humanos (Marcondes *et al.*, 2001).

Nesse estudo utilizou-se a PCR para a identificação de espécies de *Leishmania* em fragmentos de pele obtidos por meio de biópsias em pacientes com suspeita de LT. Em termos de utilidade clínica a PCR oferece várias vantagens: é mais sensível, específica e identifica o agente etiológico da doença quando comparada aos métodos convencionais de diagnóstico laboratorial. A PCR foi mais sensível que o exame parasitológico pela detecção de um dos doze casos de LT. A diferença não é significativa, mas há que se considerar limitação de tamanho da amostra, tendo em vista que a sensibilidade da PCR para o diagnóstico da LT é de 100% contra 66% para a leitura de lâminas conforme descrito por Oliveira *et al.* (2003). De todo modo, é importante que se considere a qualidade de coloração do material e a habilidade do microscopista, atributos que podem interferir na sensibilidade do método clássico.

Estudos têm revelado uma variedade no polimorfismo genético entre as diferentes espécies de *Leishmania* no Brasil. A espécie *L. (V.) braziliensis* tem particular interesse devido as recidivas, resistência ao tratamento e deformidades causadas. Alguns trabalhos investigam o polimorfismo genético da região intra-específica (Its) do RNA ribossomal dessa espécie na busca de uma co-relação da variabilidade genética com as manifestações clínicas (Ishikawa *et al.*, 2002; Falqueto *et al.*, 2003; Floeter-Winter & Shaw, 2004). Na mesoregião do Baixo Amazonas Jennings (2003) identificou a ocorrência de variação intra-específica de *L. (V.) braziliensis* revelada pela presença de três serodemas e também foi identificado por anticorpos monoclonais às espécies *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lainsoni*.

Em casos de LT causada por espécies do subgênero *Viannia*, a escassez de parasitos na lesão é uma característica comum, o que torna a confirmação parasitológica pelo exame direto ainda mais difícil. A dificuldade de se encontrarem amastigotas na lesão quando o agente etiológico é *L. (Viannia) braziliensis* é diretamente proporcional ao tempo de doença e particularmente mais difícil nos casos de leishmaniose mucosa (Marsden, 1985; Andrade *et al.*, 2005). Este fato pode ocasionar erros diagnósticos e, conseqüentemente, demora no início do tratamento.

Nesse estudo foram comparados diferentes métodos de diagnóstico em amostras de 21 pacientes portadores de lesões suspeitas de LT, mas cujo tempo de doença não ultrapassou três meses. A investigação relativamente precoce da presença do parasito na lesão desses 21 pacientes, o que é muito desejável para garantir a imediata intervenção terapêutica (Andrade *et al.*, 2005), explica o sucesso na detecção dos casos positivos ao exame parasitológico direto (11/21). Todavia, a PCR-G6PD

detectou um positivo que não havia sido revelado pelo exame parasitológico. Este 12º indivíduo portador de LT recebeu tratamento adequado graças a confirmação pelo método molecular, reconhecidamente sensível e específico (Castilho *et al.*, 2003), e se encontra atualmente curado.

O estudo de epidemiologia molecular realizado no município de Juruti permitiu o conhecimento da espécie mais prevalente naquela área, um dado epidemiológico importante na medida em que a Secretaria Municipal de Saúde enfrenta dificuldades para o tratamento da doença. Casos de reativação e de persistência das lesões, mesmo na vigência do tratamento específico, estão comumente associados aos parasitos do subgênero *Viannia*.

A resposta de pacientes com LT ao tratamento antimonial pode variar em função de fatores como a cepa do parasito envolvido, o estado imunológico do paciente e a forma clínica da doença. Os esquemas terapêuticos com antimonial pentavalente (Sb^{5+}) têm sido frequentemente modificados quanto à dose e duração da terapia (Oliveira-Neto *et al.*, 2000). Passos *et al.* (2001) observaram frequência de recidiva igual a 10% em pacientes com LT, cujo agente era *L. (V.) braziliensis*, tratados com 15mg Sb^{5+} /kg/dia.

As amostras identificadas como *L. (V.) braziliensis* (9/12) e *Leishmania (Viannia) sp* (3/12) representam um achado importante na medida em que são conhecidas as dificuldade de cultivo, isolamento e manutenção *in vitro* dos parasitos desse subgênero (Cuba-Cuba *et al.*, 1981).

O teste intradérmico de Montenegro apresentou sensibilidade de 60% mas onde a LT é endêmica a sensibilidade pode se aproximar a 100%. Foi demonstrado nesse estudo que espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, sobretudo *L. (V.)*

braziliensis predominam em Juruti, o que é compatível com o extenso diâmetro das reações cutâneas observadas ao antígeno de Montenegro e com os comuns relatos de persistência e recidiva apesar do tratamento específico (Costa *et al.*, 1996).

No diagnóstico da LT é aceitável basear-se na presença de uma lesão típica associada ao teste de Montenegro positivo e fatores epidemiológicos favoráveis, mas a confirmação da doença depende do diagnóstico do agente (Guimarães *et al.*, 2005).

Como não há uma vacina profilática para LT deve-se buscar o diagnóstico na fase inicial da apresentação clínica, evitando as complicações da doença crônica. Os poucos recursos financeiros, estrutura laboratorial e pessoal especializado representam obstáculos importantes para esta realidade em alguns municípios (Costa, 2005). O conhecimento do maior número de casos suspeitos, diagnóstico e tratamento precoce, identificação do agente etiológico, conhecimento das áreas de transmissão e redução do contato homem vetor são algumas das medidas de prevenção e controle recomendadas pelo Ministério da Saúde.

Os dados obtidos nesse trabalho podem colaborar para a elaboração de um plano de controle para a LT no município de Juruti com ações dirigidas à mineradora e a SEMSA. Como forma de controle sugere-se a mineradora construir alojamentos a uma distância mínima de 200 metros da mata, orientar o uso de repelente conforme recomendação do fabricante, orientar os funcionários a não tirar a blusa na hora de descanso, não repousar em troncos de árvores e buscar atendimento médico sempre que uma ferida demorar a cicatrizar.

À SEMSA de Juruti recomenda-se investir em atividades educativas principalmente nas comunidades rurais próximas a área de impacto da mineradora. Deve-se chamar a atenção dos agentes de endemias e agentes comunitários de saúde

para o encaminhamento imediato de pacientes com feridas que demoram a cicatrizar. Recomendar aos moradores das comunidades o uso de calça e blusa de manga comprida ao entrar na mata, informar sobre os horários de atividades do vetor. Orientar a construção de galinheiro e pocilgas distantes do domicílio. Orientar a limpeza do peri – domicílio, queima do lixo e aconselhar os moradores a não deixar cães dormirem dentro das casas.

Medidas de controle em Juruti devem priorizar a redução da morbidade pela realização do diagnóstico e tratamento precoces incluindo a busca ativa de LT humana. Além disso, deve-se investir na capacitação da equipe de vigilância para a realização de investigação entomológica e de microambientes no entorno da área de impacto de mineração.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados observados no período de estudo compreendido entre janeiro a dezembro de 2007, pode-se concluir que:

- 1- A distribuição sazonal dos casos incidentes de LT revelou as mais altas frequências nos meses de julho e agosto.
- 2- A totalidade dos casos etiologicamente confirmados era devida as espécies do subgênero *Viannia*, com predominância de *L. (V.) braziliensis* (75%).
- 3- A PCR foi ligeiramente mais sensível que o método parasitológico, o que não representou diferença significativa.
- 4- Entre as espécies antropofílicas que compõem a fauna flebotomínica destacam-se *Lu. complexa* (17%) e *Lu. flaviscutellata* (10%) por serem vetores de espécies de *Leishmania* associadas as formas graves da doença em humanos.
- 5- A maioria dos pacientes eram homens que residiam na zona rural e exerciam atividades de risco.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, J.M., CHOCIAY, M.F., NASCIMENTO, M.M. P., FIGUEIREDO, J.F.C., ROSELINO, A.M.F. Maxadilan (MAX) – Proteína salivar de *Lutzomyia longipalpis*: detecção de anticorpos antiMAX em leishmaniose tegumentar americana (LTA) e expressão gênica e protéica de MAX em *Lutzomyia neivai*. **Anais Brasileiros de Dermatologia do Rio de Janeiro**, **80 (3)**: 333-380, 2005.
- ALEIXO, J.A., NASCIMENTO, E.T., MONTEIRO, G.R., FERNANDES, M.Z., RAMOS, A.M.O., M.E., WILSON, R.D., PEARSON, S.M.B. JERONIMO. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **100**: 79-82, 2006.
- AMATO, V.S., TUON, F.F., SIQUEIRA, A.M., NICODEMO, A.C., NETO, V. A. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, **77(2)**: 266-74, 2007.
- ANDRADE, B.B. Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar. **Gazeta médica Bahia**, 75-82, 2005.
- ANDRA-FILHO, J.D., VALENTE, M.B., ANDRADE, W.A., BRAZIL, R.P., FALCÃO, A.L. Flebotomíneos do Estado do Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **34 (4)**: 323-329, 2001.
- AWASTHI, A., MATHUR, R.K. & SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian Journal of Medical Research**, **119**: 238-258, 2004.

- BASANO, S.A. & CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, **7(3)**: 328-337, 2004.
- BENSOUSSAN, E., ABDELMAJEED, N., FLORY, J., SCHNUR, L.F., JAFFE1, C.L. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, **44(4)**: 1435-1439, 2006.
- BRANDÃO-FILHO, S.P., BRITO, M.E.F., MARTINS, C.A.P., SOMMER, I.B., VALENÇA, F., ALMEIDA, F.A., GOMES, J. Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical**, **31**: 575-578, 1998.
- BRANDONISIO, O., SPINELLI, ROSA., PEPE, M. Dendritic cells in *Leishmania* infection. **Microbes and Infection** **6**: 1402–1409, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnóstico clínico e diferencial**. Brasília, Ministério da Saúde, p.136, 2006.
- CALVOPINA, M., GUEVARA., AG., ARMIJOS, R.X., HASHIGUCHI, Y., DAVIDSON, R.N., COOPER, P.J. Itraconazole in the treatment of New World mucocutaneous. **Leishmaniasis International Journal of Dermatology**, **43 (9)**: 659-63, 2004.
- CAMARGO, L.M.A & BARCINSKI, M.A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, **55(1)**: 34-37, 2003.

- CASTILHO, T.M. **Caracterização do gene que codifica a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase em *Leishmania amazonensis***. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 2005. 69p.
- CASTILHO, T.M., SHAW, J.J., FLOETER-WINTER, L.M. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**: 540-546, 2003.
- CHAGAS, A.C., PESSOA, F.A.C., MEDEIROS, J.F; PY-DANIEL, V., MESQUITA, E.C., BALESTRASSI, D.A. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em uma vila de exploração de minérios - Pitinga, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. **Revista Brasileira Epidemiologia**, **(9)**: 186-192 2006.
- CONSIGLI, J., DANIELO, C., GALLERANO, V., PAPA, M., GUIDI, A. Cutaneous leishmaniasis: successful treatment with itraconazole. **International Journal of Dermatology**, **45 (12)**:1446-1447, 2006.
- COSTA, J.M.L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**; 75 (1): 3-17, 2005.
- COSTA, J.M.L., LAGO E.L., MAGAHLÃES, A.V., MARSDEN, P.D. Leishmaniose recidiva cútis causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, **71**: 329-333, 1996.
- CUBA-CUBA, C.A., MARSDEN, P.D., BARRETO, A.C., ROCHA, R., SAMPAIO, R.R., PATZLAFF L. Parasitologic and immunologic diagnosis of American mucocutaneous leishmaniasis. **Bulletin of the Panamerican Health Organization**, **15**: 249-259, 1981.

- DESJEUX, P. Leishmaniasis Public Health Aspects and Control. **Clinics in Dermatology**, **14**: 417-423, 1996.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **95**: 239-243, 2001.
- DIAS-LIMA, A., BERMÚDEZ, E.C., MEDEIROS, J.F., SHERLOCK, I. Estratificação vertical da fauna de flebótomos (Diptera, Psychodidae) numa floresta primária de terra firme da Amazônia Central, Estado do Amazonas, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, **18 (3)**: 823-832, 2002.
- DIAS-SVERSUTTI, A.C., SCODRO, R.B.L., REINHOLD-CASTRO, K.R., NEITZKE, H.C., TEODORO, U. Estudo da preferência alimentar de *Nyssomyia neivai* (Pinto) e *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) em área rural do Paraná. **Neotropical Entomology**, **36 (6)**: 953-959, 2007.
- DORVAL, C.M.E.M., OSHIRO, E.T., CUPOLLILO, E., CASTRO, A.C.C., E ALVES, T. P. Ocorrência de Leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **39(1)**: 43-46, 2006.
- DOURADO, M.I.C., NORONHA, C.V., ALCANTARA, N. Epidemiology of leishmaniasis related to agriculture and prospecting in a locality of the State of Bahia, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, **23(1)**: 2-8, 1989.
- FALQUETO, A., SESSA, P.A., FERREIRA, A.L., VIEIRA, V. P., SANTOS, C.B., VAREJÃO, J.B.M., CUPOLLILO, E., PORROZZI, R., CARVALHO-PÄES, L.E., GRIMALDI JR, G. Epidemiological and Clinical Features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, **98 (8)**: 1003-1010, 2000.

- FEITOSA, M.A.C., & CASTELLON, E.G., Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos de floresta ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. I. Estratificação Vertical. *Acta Amazonica*, 36 (4): 539-548, 2006.
- FERNANDES, A.P., NELSON, K., BEVERLEY, S.M. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in Kinetoplastid protozoa: Perspectives on the age and origins of parasitism. **Proceedings National Academy Science the Unites States Aerica**, **90**: 11068-11612, 1993.
- FLOETER-WINTER, L.M., SHAW, J.J. New horizons in the identification and taxonomy of the *Leishmania* and the diagnoses of the leishmaniasis: the expansion of molecular techniques. **Research Advances in Microbiology**, **4**, 2004.
- FRAIHA, H. Saúde em Carajás. In: **Saúde na Amazônia**. Linhares, A.C. 2. ed. [s.l.], ANPES, 1983. p. 113-116.
- FRAIHA, H., SHAW, J.J., LAINSON, R. Phlebotominae Brasileiros – II. *Psychodopygus wellcomei*, Nova espécie antropofila de flebótomo do grupo squamiventris, do sul do Estado do Pará, Brasil (Diptera, Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **69 (3)**: 489-500, 1971.
- FRAIHA, H., WARD, R.D., QUINTANA, J. Taxonomia de psychodopygus amazonensis (Root, 1934) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Revista da FSESP**, **25(1)**:5-23, 1980.
- FUNASA. **Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília, Ministério da Saúde, 2007. 179p.

- FUNASA. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes portadores da co-infecção *Leishmania*-HIV.** Brasília. Brasília, Ministério da Saúde, 2004. 72p.
- GARCEZ, L.M., GOTO, H., RAMOS, P.K., BRIGIDO, M.DO C., GOMES, P.A., SOUZA, R.A., DE LUCA, P.M., MENDONÇA, S.C., MUNIZ, J.A., SHAW, J.J. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-induced cutaneous leishmaniasis in the primate *Cebus apella*: a model for vaccine trials. **International Journal of Parasitology**, **19 (14)**: 1755-1764, 2002.
- GENARO, O.D., VICENTE, P.C.P.T., COSTA, C.A., HERMETO, M.V., LUIS CARLOS C. A., MAYRINK, W. Vaccine for Prophylaxis and Immunotherapy, Brazil. **Clinics in Dermatology**, **14**: 503-512, 1996.
- GOMES, A. C., COUTINHO, S. G., PAIM, G.V., OLIVEIRA, S. M. O., GALATI, E. A. B, NUNES, M. P., CAINZAKI, A. N., YAMAMOTO, Y. I., ROTTER, P. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. Avaliação da atividade enzootica da *Leishmania (Viannia) braziliensis* em ambiente florestal e peridomiciliar, região do vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de medicina tropical de São Paulo**, **32**: 105-115, 1990.
- GONTIJO, B. & CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36 (1)**: 71-80, 2003.
- GRIMALDI JR G., & TESH R.B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clinical Microbiology Reviews**, **6 (3)**: 230-250, 1993.

- GRIMALDI JR, G., DAVID, JR, MCMAHON-PRATT, D. Identification and distribution of New World Leishmania species characterized by serademe analysis using monoclonal antibodies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **36**: 270-287, 1987.
- GRIMALDI JR, G., MOMEN, H., NAIFF, R.D., MCMHON-PRATT, D. & BARRETT, T.V. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon Region of Brazil. **The American Journal Tropical Medicine Hygiene** **44**: 645-661, 1991.
- GUERRA, J.A.O., RIBEIRO, J.A.S., COELHO, L.I.A.R.C., BARBOSA, M.G.V., PAES, M.G. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na comunidade de São Joao, Manaus, Amazonas, Brasil. **Caderno de Saúde Publica do Rio de Janeiro**, **22 (11)**: 2319-2327, 2006.
- GUERRA, J.A.O., TALHARI, S., PAES, M.G., GARRIDO, M., TALHARI, J.M. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos a infecção na Amazonia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36 (5)**: 587-590, 2003.
- GUIMARÃES, L.H., MACHADO, P.R.L., A. LESSA, H.A., ARGEMIRO 'OLIVEIRA JR., CARVALHO E.M. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar. **Gazeta Médica da Bahia**, **75 (1)**: 66-74, 2005.
- HANAHAN, J., JESSEE, F.R BLOOM. DNA Cloning: A Practical Approach, Techniques for transformation of E. coli, 2.ed. Oxford, IRL Press, 2002
- IKUTA, Y.M. & ISHIKAWA, E.O.Y. Avaliação Imunoenzimatica e Molecular de cepas *Leishmania (V) Lansonii*. **Revista Paraense de Medicina**, **17(3)**: 2-6, 2003.

- ISHIKAWA, E.O.Y., SILVEIRA, F.T., MAGALHÃES, A.L.P., GUERRA-JR, R.B., MELO, M.N., GOMES, R., SILVEIRA, T.G.V., SHAW, J.J. Genetic Variation In Populations Of Leishmania Species In Brasil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 96 (1): 111-121, 2002.
- JANKOVIC. D., SHER. A, YAP G. Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. **Current Opinion in Immunology**, 13 (4): 403-409, 2001.
- JENNINGS, Y.L.L. **Caracterização isoenzimática por anticorpos monoclonais dos agentes da leishmaniose tegumentar americana (LTA) na mesoregião do Baixo Amazonas, Pará, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, 2003, 129p.
- JOSÉ, F.F., SILVA, I.M., ARAÚJO, M.A., ALMEIDA, R.P., BACELLAR, O E CARVALHO, E.M. Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 34 (6): 537-542, 2001.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência & Cultura**, 44: 94-106, 1992.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* sp. n. a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. **Annales Parasitologie Humaine Comparée** 64: 3-9, 1989.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. Leishmaniasis in Brasil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis – incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 62 (3): 385-386, 1968.

- LAINSON, R. & SHAW, J.J. New World leishmaniasis: The neotropical *Leishmania* species. In: **Topley & Wilson's microbiology and microbial infectious diseases**. 9th. Collier, L., Balows, A., Sussman, M. (eds). London, Arnold; 1998. p. 241-66.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. Parasitology supplement: Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-American. **Nature**, **273**: 595-600, 1978.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. The role of animals in the epidemiology of the South American leishmaniasis. In: **The Biology of the Kinetoplastida**. Lumsden, W.H.R & Evans, D.A. (eds.). v. 2. Academic Press, London, 1979.
- LAINSON, R., SHAW, J.J., SILVEIRA, F.T., SOUZA, M.A., BRAGA, R.R., ISHIKAWA, E.A.Y. The Dermal *leishmaniasis* of Brazil, with Special Reference to the Eco-epidemiology of the Disease in Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **89** (3): 435-443, 1994.
- LAINSON, R., SHAW, J.J., SILVEIRA, F.T., BRAGA, R.R., RYAN, L., PÓVOA, M.M., ISHIKAWA, E.A.Y. A *Leishmania* e as leishmanioses. In: **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical**. Fundação Serviços de Saúde Pública. Belém,. v.1, 83-124, 1986.
- LAINSON, R., WARD, R.D., SHAW, J.J. Cutaneous leishmaniasis in North Brasil: *Lutzomyia anduzei* as a major vector. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **70**: 171-172, 1976.
- LE PONT, F & DESJEUX, F. Leishmaniasis in Bolivia. II. The involvement of *Psychodopygus yucumensis* and *Psychodopygus llanosmartinsi* in the selvatic transmission cycle of *Leishmania braziliensis braziliensis* in a lowland subandean region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, **81** (3): 311-318, 1986.

- LE PONT, F., BRENIERE, F.S., MOUCHET, J., DESJEUX, F. Leishmaniose en Bolivie. III *Psychodopygus carrerai carreari* (Barreto, 1946) nouveau vecteur de *leishmania braziliensis braziliensis* en milieu sylvatique de region subandine basse. **Academic Science Paris**, **307 (III)**: 279-282, 1988.
- LIMA, E.B., PORTO, C., MOTTA, J.O.C., SAMPAIO, R.N.R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Annais Brasileiro de Dermatologia**, **82 (2)**: 111-24, 2007.
- MARCONDES, C.B., SANTOS-NETO, L.G., LOZOVEI, A. L. Ecology of Phebotomine sandlies (Diptera: Psychodidae) in Brazilian Atlantic Forest. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **34 (3)**: 255-206, 2001.
- MARFURT, J., NASEREDDIN, A., NIEDERWIESER, I., JAFFE, C.L., BECK, H.P., FELGER, I. Identification and Differentiation of *Leishmania* Species in Clinical Samples by PCR Amplification of the Miniexon Sequence and Subsequent restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, **41(7)**: 3147-3153, 2003.
- MARSDEN, P.D. Clinical presentation of *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Parasitology Today**, **1 (5)**: 129-133, 1985.
- MOHEBALI, M., FOTOUHI, A., HOOSHMAND, B., ZAREI, Z., AKHOUNDI, B., RAHNEMA, A., RAZAGHIAN, A.R., KABIR, M.J. NADIM, A. Comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) by a randomized clinical trial in Iran. **Acta Tropica**, **103 (1)**: 33-40, 2007.
- MULLER, I., KROPF, P., LOUIS, J.A., ETGES, R.J. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: Role of CD8+ T cells. **Infection and Immunity**, **61**: 2575-2581, 1993.

OLIVEIRA, C.I., BAFICA, A., OLIVEIRA, F., FAVALI, C.B.F., CORREA, T., FREITAS, L.A.R., NASCIMENTO, E., COSTA, J.M., BARRAL, A. Clinical Utility of Polymerase Chain Reaction–Based Detection of *Leishmania* in the Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, **37**: 149–53, 2003.

OLIVEIRA-NETO, M.P., MATTOS, M., PIRMEZ, C., FERNANDES, O., GONÇALVES-COSTA, S.C.; SOUZA, C.F.S. & GRIMALDI JUNIOR, G. - Mucosal leishmaniasis (“espundia”) responsive to low dose of N-methyl glucamine (Glucantime ®) in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical Sao Paulo**, **42 (6)**: 321-325, 2000.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Prevenção e controle de enfermidades**: Leishmaniose. Disponível em:
<http://www.opas.org.br/prevencao/temas.cfm?id=56&Area=Conceito&pag_atua l=1&direcao=posterior>. Acesso em: 13/12/2006.

PARÁ. Governo do Estado. Secretaria Especial de Gestão. **Estatística municipal**: Juruti. Belém: SEPOF, 2006. p. 9.

PASSOS, V. M. A., BARRETO, S.M., ROMANHA A. J., KRETTLI A.U., VOLPINI Â.C., GONTIJO C.M.F., FALCÃO A. L., LIMA-COSTA, M. F. F. Leishmaniose tegumentar na Região Metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos (1989-1995). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **34 (1)**: 5-12, 2001.

PEREIRA, E.A., FAIAL, A.S., MARTINS, N. JENNINGS, Y.L. Secretaria Executiva de Saúde Pública do Estado do Pará/ Departamento de Controle de Endemias. Disponível: <<http://www.sespa.pa.gov.br/portal/page>>. Acesso em: 20 mar. 2008.

- PINHEIRO, M.C.N., XAVIER, M.B., CARDOSO, B.S., FERREIRA, M.M., ISHIKAWA, E. A. I., SILVEIRA, F.T. .Ensaio Clínico Aberto Comparando a Mefloquina e o Antimoniato de Meglumina no Tratamento da leishmaniose tegumentar Americana na Amazônia. **Revista Paraense de Medicina** ,**16(1)**: 19-24, 2002
- PRATA, A.; SILVA-VERGARA, M.L; COSTA, L. *et al.* Efficacy of azithromycin in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36**: 65-69, 2003.
- REINER, S.L. & LOCKS-LEY, R.M. The Regulation of Immunity to *Leishmania major*. **Annual Review of Immunology**, **13**: 151-177, 1995.
- SAIKI, R.K., BUGAWAN, T.L., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. **Nature**, **324**: 163-166, 1986.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning**: a Laboratory Manual. 3. ed. Nova York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 1, p. 135.
- SAVANI, E.S.M.M., CAMARGO, M.C.G.O., CARVALHO, M.R., ZAMPIERI, R.A., SANTOS, M.G.S., D'ÁURIA, S.R.N., SHAW, J.J., FOETER-WINTER, L.M. The first Record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brasil. **Veterinary Parasitology**, **120**: 229-233, 2004.
- SCHNARE, M.N., COLLINGS, J.C., SPENCER, D.F., GRAY, M.W. The 28S -18S rDNA intergenic spacer from *Crithidia fasciculata*: repeated sequences, length heterogeneity, putative processing sites and potential interactions between U3

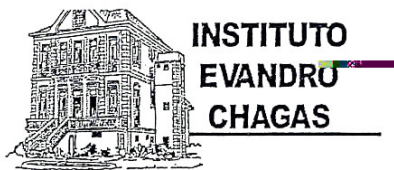
- small nucleolar RNA and the ribosomal RNA precursor. **Nucleic Acids Research**, **28**: 3452-3461, 2000.
- SHAW, J. J., ISHIKAWA, E. A. Y., LAINSON, R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **83**: 783-784, 1989.
- SHAW, J.J. The leishmaniasis: survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **102 (5)**: 541-547, 2007.
- SILVEIRA, F.T & MAYRINK, W. Leishmaniose cutânea difusa no Estado do Para, Brasil. Relato de cura de 1 caso depois de 24 anos de doença, após tratamento combinado de quimioterapia com imunoterapia. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 33., Belo Horizonte, 1997. Pôster 42, p.129.
- SILVEIRA, F.T., ISHIKAWA, E.A., DE SOUZA, A.A., LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belem, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite**, **9 (1)**: 43-50, 2002.
- SILVEIRA, F.T., LAINSON, R., CORBETT, C.E.P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **99 (3)**: 239-251, 2004.
- SILVEIRA, F.T., LAINSON, R., CORBETT, C.E.P. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **100 (5)**: 525-534, 2005.

- SILVEIRA, F.T., SOUZA, A.A.A., LAINSON, R., SHAW, J.J., BRAGA, R.R., ISHIKAWA, E. A. Cutaneous leishmaniasis in the amazon region: natural infection os the *lutzomyia ubiquitalis* (psychodidae: phelebotominae) by *Leishmania (Viannia) Lainsoni* in Pará, State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **86 (1)**: 127-130, 1991.
- SOUZA, A. A. A., SILVEIRA, F. T., BARATA, I. R., SILVA, M. G.S., LIMA, J. A.N., PIRES, R. N.B., SILVA, S. F., ISHIKAWA, E. A.I. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de Santarém – Para Floresta Nacional do Tapajós-Flona, BR. 163 – Santarém – Cuiabá – KM 67. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, **36 (1)**: p 347, 2003.
- SOUZA, A., ISHIKAWA, E., BRAGA, R., SILVEIRA, F., LAINSON, R., SHAW, J. *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania braziliensis* to humans in Pará State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** (90) 112-113, 1996.
- STAFFORD, J.L., NEUMANN, N.F., BELOSEVIC, M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. **Critical Reviews in Microbiology**, **28 (3)**: 187-248, 2002.
- STEVEN, G.R. Diagnosis of Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, **24**: 471-478, 1996.
- TEIXEIRA, A.C.; PAES, M.G.; GUERRA, J.O.; PRATA, A. & SILVA-VERGARA, M.L. - Low efficacy of azithromycin to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo**, **49 (4)**: 235-238, 2007.

- THAKUR, C.P. Leishmaniasis research: the challenges ahead. **Indian Journal of Medical Research**, **123**: 193-194, 2006.
- ULIANA, S.R., AFFONSO, M.H., CAMARGO, E.P., FLOETER-WINTER, L.M. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. **Experimental Parasitology**, **72**: 157-163, 1991.
- ULIANA, S.R., FLOETER-WINTER, L.M. Specificity Of A Ribosomal Dna Derived Oligonucleotide Probe In The Diagnosis Of Cutaneous Or Mucocutaneous Leishmaniasis. **Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science** **48 (5/6)**: 367-369, 1996.
- VOLPINI, A.C., PASSOS, V.M. A, OLIVEIRA, G.C., ROMANHA, A.J. PCR_RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, **90**: 31-37, 2004.
- WARD, R. D., FRAIHA, H. *Lutzomyia umbratilis*, a new species of sandfly from Brazil (Diptera: Psychodidae). **Journal Medical Entomology** **14 (3)**: 313-317, 1977.
- WEISS, J.B. DNA Probes and PCR for Diagnosis of Parasitic Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, **8**: 113-130, 1995.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**: disease information. Geneva, WHO, 2006. Disponivel em:
<<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>>. Acesso em 13/12/2006.
- YOUNG D.G. & DUNCAN M.A. **Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)**. Gainesville, Associated Publishers, American Entomological Institute: p. 881, 1994. (Memoirs of the American Entomological Institute, 54).

ANEXOS

ANEXO A



Carta de nº 003/2008

Protocolo CEP/IEC – Nº 0029/07

CAAE: 0032.0.072.000 – 07

Ananindeua/PA, 26 de fevereiro de 2008

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto: “Epidemiologia da leishmaniose tegumentar no município de Juruti -Pará”.

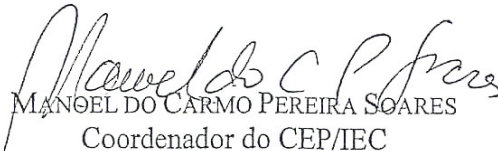
Pesquisador Responsável: DANIELA CRISTINA SOARES

Conforme reunião do CEP/IEC realizada no dia 25 de fevereiro de 2008, o projeto em questão foi considerado **aprovado**.

Recomenda-se ao coordenador que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto, inclusive, as fichas preenchidas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Relatório Final – deverá ser elaborado um consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.


MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
Coordenador do CEP/IEC

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Por favor, leia as informações e discuta com quem desejar. Pergunte-nos se houver algo que não esteja claro ou caso queira mais informações.

Saúde no município de Juruti, Pará: cenário atual, desafios e possibilidades

Coordenadoras: Dras. Lourdes Maria Garcez e Marinete Marins Póvoa - Instituto Evandro Chagas (Seção de Parasitologia), BR 316, Km 07 – CEP 67.030-000 – Ananindeua-PA. Tels: 091-3214-2152 e 3214-2148

SUBPROJETO LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**Data:****1. Qual é o objetivo do estudo?**

É conhecer melhor certos problemas de saúde dos habitantes de Juruti e assim contribuir com a Secretaria de Saúde para diagnosticar, tratar e evitar esses problemas.

2. Por que eu fui escolhido?

Porque você veio a uma unidade de saúde para se tratar ou porque você mora em uma área que os pesquisadores pretendem visitar.

3. Qual doença vocês estão pesquisando?

Doença transmitida por insetos que sugam o nosso sangue que sem tratamento pode ser grave.

- Leishmaniose Tegumentar (ferida brava) – transmitida pela picada do inseto tatuquira

4. Sou obrigado a participar da pesquisa?

Não! Você é livre para decidir e para retirar seu consentimento a qualquer tempo, sem se justificar e sem que isso afete os cuidados dos pesquisadores com sua saúde ou seu relacionamento com eles.

5. Se eu aceitar, o que tenho que fazer?

Para a maioria pediremos que permita um ou no máximo dois exames. Em alguns casos pediremos que permita outros exames: 1- teste de pele parecido com vacinação 2-; retirada de um pequeno fragmento de pele se apresentar alguma ferida.

6. Quais os riscos para quem participar?

Para quem tiver suspeita de ferida brava um risco é sentir desconforto ao se tirar um pedacinho da borda da ferida com anestesia ou ao se realizar um teste de pele semelhante à vacinação, que poderá causar vermelhidão local, mas sumirá em poucos dias. O trabalho será feito por pessoas experientes, sendo o atendimento médico no Hospital.

7. Quais benefícios para quem participar?

Os exames servem para você saber qual doença você tem e assim fazer o tratamento correto. Na Secretaria de Saúde pretendemos implantar novos métodos de diagnóstico e modernizar o que já está sendo feito. O Sistema Único de Saúde (o SUS) ficará mais forte e atenderá melhor às necessidades da população de Juruti.

8. E se eu quiser fazer alguma reclamação?

Na improvável situação de você ou suas crianças se sentirem prejudicados poderão protestar. A Secretária de Saúde ou sua substituta (Dra. Márcia ou Sra. Ariadne) são as autoridades no município que podem dar informações sobre o projeto ou auxiliá-los a manifestar algum protesto na justiça, caso desejem.

9. Minha participação nesse estudo será confidencial?

Sim. Todas as informações sobre você ou seus familiares nesta pesquisa serão confidenciais e usadas apenas para análise dos resultados. Seu nome ou de seus familiares não serão revelados fora das instituições de pesquisa.

10. Quem está coordenando e quem financia a pesquisa?

O Instituto Evandro Chagas coordena e faz os exames de laboratório. As amostras de sangue ou outro material biológico utilizado na pesquisa ficarão depositadas no Instituto Evandro Chagas. A Secretaria de Saúde de Juruti faz o seu atendimento normal e tratamento das pessoas doentes. A ALCOA financia a maior parte. O governo Federal financia a outra parte.

11. Como obter mais informações?

No Hospital de Juruti. Pergunte na recepção como se dirigir a nós. Se desejar, pode falar com as Coordenadoras da Pesquisa, Dras. Lourdes Maria Garcez (0-XX-91-3214-2152) e Marinete Póvoa (0-XX-91-3214-2148),

12. Se eu concordar em participar ou que minhas crianças participem, o que devo fazer?

Neste caso lhe será pedido que assine este termo de consentimento. Você também será convidado a assinar um termo para cada menor sob a sua responsabilidade que você concorde que participe do estudo. Leia abaixo!

Nome / sexo / idade:

Endereço:

Para autorizar a SUA PARTICIPAÇÃO marque com um "X" se concordar com os termos

1. **PARTICIPAÇÃO DE ADULTO:** Confirmo que li, entendi as informações sobre o estudo no **termo de consentimento livre e esclarecido** e tive oportunidade de fazer perguntas, por isso concordo em participar da pesquisa.
2. **PARTICIPAÇÃO DE CRIANÇA:** Confirmo que li, entendi as informações sobre o estudo no **termo de consentimento livre e esclarecido** e tive oportunidade de fazer perguntas por isso concordo que o menor, cujo nome está descrito acima, participe da pesquisa.

Nome da pessoa que consente

Assinatura

Nome da pessoa que obteve o consentimento

Assinatura

Testemunhas (necessárias quando o indivíduo que deseja participar não puder assinar seu nome)

Nome da testemunha 1

Assinatura

Nome da testemunha 2

Assinatura

ANEXO C

MS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE


**INSTITUTO
EVANDRO
CHAGAS**

NOME:	Nº PROTUÁRIO
DATA NASC:	SEXO:
END:	BAIRRO:
CIDADE:	UF:
ZONA: () URBANA () RURAL: () TERRA FIRME () VÁRZEA	
OCUPAÇÃO:	EMPRESA:
Nº DE LESÕES:	Nº LÂMINA:
TEMPO DE DOENÇA:	
EXAMES REALIZADOS:	RESULTADO:
() Teste de Montenegro	() P () N R= _____
() Parasitológico	() P () N
BIÓPSIAS:	
() em NET	
() em Formol 10 %	
SANGUE para separar o soro: () sim () não	
OBS:	