

MODALIDADES CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO E ABORDAGEM TERAPÊUTICA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO BRASIL

CLINICAL MODALITIES, DIAGNOSIS AND THERAPEUTIC APPROACH OF THE TEGUMENTARY LEISHMANIASIS IN BRAZIL

Jackson M.L. Costa, Ana Cristina R. Saldanha, Diego Nasciento, Gilmar Sampaio, Franklin Carneiro, Eduardo Lisboa, Lorena M. Silva, Aldina Barral

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-Bahia, Brasil

A leishmaniose tegumentar (LT) é representada por um grupo de doenças com características clínicas e imunopatológicas distintas. Vários fatores podem interferir nessas diferenças, destacando-se a resposta imune do hospedeiro e os inerentes ao parasita *Leishmania*, que podem aumentar ou atenuar o seu poder patogênico. No Brasil, os principais agentes da LT são a *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. Em relação às formas clínicas, destaca-se a leishmaniose cutânea (LC), mucosa (LM), cutânea difusa (LCD) e a disseminada (LD). A LC é a forma mais comum, apresenta-se com uma ou várias lesões ulceradas, tem predileção por áreas expostas do corpo. A LM ocorre concomitante ou anos após quadro de LC em 2 a 5% dos casos e pode progredir para destruição da mucosa nasal. A LCD é considerada rara caracterizando-se por nódulos e lesões em placas infiltradas de maneira difusa pelo tegumento, em pacientes anérgicos a antígenos de *Leishmania*. A LD apresenta inúmeras lesões acneiformes, papulosas e ulceradas, às vezes associadas a sinais e sintomas como febre, perda de peso, calafrios e astenia, sugerindo disseminação hematogênica do parasita. O diagnóstico é clínico e laboratorial, utilizando-se exames imunológicos (intradermorreação de Montenegro, sorologia) e parasitológicos (esfregaço das bordas da lesão, biopsia com anatomopatológico, imuno-histoquímica, cultura em meios artificiais, inoculação em animais experimentais e mais recentemente a reação de cadeia de polimerase/PCR). No tratamento utilizam-se drogas como os antimoniais pentavalentes (Sb⁺⁵), anfotericina B e as pentamidinas. O critério de cura é clínico.

Palavras-chave: leishmaniose cutânea, cutânea disseminada, cutânea difusa, mucosa, doença endêmica, clínica, diagnóstico, terapêutica, Brasil.

Tegumentary leishmaniasis (TL) comprises a group of diseases with distinct clinical and immunopathological characteristics. Several factors are responsible for these differences, including the host immune response and Leishmania related factors that may increase or attenuate the pathogenic potential of the parasite. In Brazil, the main causative agents of TL are L. braziliensis, L. guyanensis and L. amazonensis. Clinical forms of the disease include cutaneous leishmaniasis (CL), mucosal (ML), diffuse cutaneous (DCL) and disseminated leishmaniasis (DL). CL is the most common form and is characterized by the presence of one or several ulcerated lesions, with a preference for exposed areas of the body. ML occurs concomitantly or years after the onset of CL in 2 to 5% of cases and may progress to destruction of the nasal mucosa. DCL is considered to be rare and is characterized by nodules and infiltrated plaques appearing diffusely over the skin in anergic patients to Leishmania antigens. DL is characterized by numerous acneiform, papular and ulcerated lesions, sometimes associated with signs and symptoms such as fever, weight loss, shivering and asthenia, suggesting blood dissemination of the parasite. The diagnosis is made by clinical and laboratory investigation using immunological (Montenegro skin test, serology) and parasitological exams (smear from the borders of the lesion, biopsy with anatomopathological analysis, immunohistochemistry, culture in artificial media, inoculation into animals and, more recently, by the polymerase-chain reaction/PCR). The treatment is using drugs such as pentavalents antimonials (Sb⁺⁵), amphotericin B and pentamidines. The cure definition is clinical.

Key words: Cutaneous leishmaniasis, disseminated cutaneous leishmaniasis, diffuse cutaneous leishmaniasis, mucosal leishmaniasis, clinic, diagnosis, therapy, Brazil.

A cadeia epidemiológica da leishmaniose tegumentar (LT) nas Américas envolve a interação entre insetos flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus* (vetores), mamíferos de várias espécies, silvestres, peridomésticos ou domésticos

Recebido em 16/05/2009

Aceito em 08/06/2009

Endereço para correspondência: Dr. Jackson M.L. Costa, Laboratório de Imunoparasitologia (LIP) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Bahia, Rua Valdemar Falcão, 121(Candeal), Salvador/Bahia CEP: 40295-001. Endereço eletrônico: jcosta@bahia.fiocruz.br Tel. (+5571) 31762351 Fax: (+5571) 31762279.

Gazeta Médica da Bahia

2009;79 (Supl.3):70-83

© 2009 Gazeta Médica da Bahia. Todos os direitos reservados.

(reservatórios naturais), parasita do gênero *Leishmania*, de vários subgêneros, espécies ou subespécies e suas variedades (agente etiológico) e o homem (hospedeiro definitivo)^(52,34).

As principais espécies de leishmanias identificadas no Brasil como causadoras de LT, os possíveis reservatórios e vetores envolvidos, encontram-se assim distribuídos: a) *Leishmania (V) braziliensis* - espécie predominante em várias regiões do Brasil, onde a LT é endêmica, ocorrendo em áreas de colonização antiga e recente, com baixa prevalência no estado do Amazonas^(4, 38, 72). Está associado à presença de animais domésticos no seu ciclo de transmissão como prováveis reservatórios. É transmitida por diferentes espécies de

flebotomíneos como *Lutzomyia whitmani*, *Lu. wellcomei* e *Lu. intermedia*, dentre outras⁽⁶⁴⁾; b) *L. (V) guyanensis* - encontrada na Bacia Amazônica, ao norte do Rio Amazonas, com prevalência nos estados do Amazonas e Acre. Está associada a animais desdentados e marsupiais e as principais espécies de flebotomíneos envolvidas na sua transmissão são o *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani*^(34, 51, 70); c) *L. (V) naiffi* - isolada de casos nos estados do Pará e Amazonas. Tem o tatu como reservatório natural e seus vetores principais são o *Lu. squamiventris*, *Lu. paraensis* e *Lu. Ayroza*^(34, 52, 73); d) *L. (V) shawi* - relacionada a casos esporádicos no Amazonas, Pará e Maranhão^(34, 70). Tem como reservatório vários animais silvestres como o macaco, a preguiça e procionídeos, e como vetor o *Lu. whitmani*^(34, 52, 64, 70); e) *L. (V) lainsoni* - casos registrados na Amazônia (Pará e Acre), sendo a paca o animal suspeito de ser o reservatório natural e o *Lu. ubiquitous* provável vetor^(4, 34, 52, 64); f) *Leishmania (L.) amazonensis* - identificada em várias regiões do Brasil^(72, 51, 7, 8). Envolvida com lesões cutâneas, incluindo a forma difusa (LCD), seus reservatórios são roedores e marsupiais e os principais vetores envolvidos são o *Lu. flaviscutellata* e *Lu. Olmea*^(13, 34, 60).

Os flebotomíneos, vetores da LT, ingerem os parasitas quando picam o reservatório vertebrado infectado. As formas amastigotas, que vivem dentro da célula no hospedeiro vertebrado, transformam-se em promastigotas no intestino do vetor, diferenciando-se em promastigotas metacíclicas por volta de uma semana. A infecção por *Leishmania* ocorre quando a fêmea infectada, ao realizar o repasto sanguíneo necessário para maturação dos ovos, inocula o parasita no hospedeiro vertebrado, incluindo o homem^(9, 62).

A interação entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro pode desencadear uma série de eventos responsáveis pela ocorrência de diferentes manifestações clínicas. Devido a esta complexidade, as formas clínicas da LT têm permitido diversas classificações⁽²⁵⁾. No Brasil, caracteriza-se por lesão de pele e/ou mucosa, única ou múltipla abrangendo desde formas inaparentes ou lesões de pele

discreta com evolução para cura espontânea, até formas com ulcerações múltiplas e comprometimento de mucosas, havendo tendência a metástase e recidivas^(25, 45, 47, 62).

Alguns autores propõem uma classificação clínica baseada em critérios como fisiopatogenia, aspecto e localização das lesões, incluindo a infecção inaparente e a leishmaniose ganglionar^(25, 32, 47). Na prática a doença se manifesta clinicamente sob duas formas: leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM) que podem apresentar diferentes manifestações clínicas⁽⁵²⁾.

As distintas formas de apresentação, bem como aspectos relacionados às abordagens diagnósticas e terapêuticas serão discutidas a seguir:

Modalidades clínicas da leishmaniose tegumentar (LT)

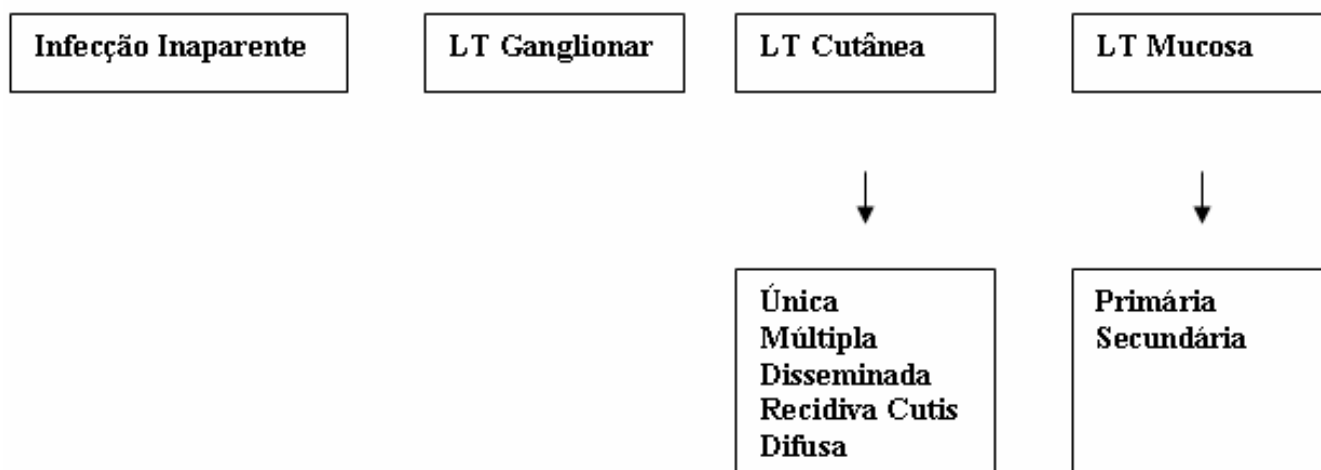
Esquemáticamente as LT no Brasil apresentam a configuração do quadro abaixo.

Infecção inaparente

O reconhecimento da infecção sem manifestação clínica baseia-se em resultados positivos de testes sorológicos (Imunofluorescência indireta/RIFI e a enzyme linked immunosorbant assay/ELISA e intradermoreação de Montenegro/IDRM) em indivíduos aparentemente saudáveis, residentes em áreas de transmissão de LT, com história prévia negativa para a doença e ausência de cicatriz cutânea sugestiva de LC ou de lesão mucosa. Não existem marcadores clínicos, epidemiológicos ou laboratoriais capazes de prever o potencial de evolução desses indivíduos para o desenvolvimento de manifestações clínicas, não sendo indicado tratamento para esses pacientes.

Leishmaniose ganglionar

Linfadenopatia localizada na ausência de lesão tegumentar. Evolutivamente, pode preceder a lesão tegumentar e deve ser diferenciada da linfangite ou linfadenomegalia satélite que podem surgir após o estabelecimento da lesão^(2, 11, 34).



Leishmaniose cutânea

A lesão cutânea primária desenvolve-se no local da picada após um período de incubação médio de 30 dias, podendo variar de dias a anos. Inicialmente, surge uma lesão eritemato-papulosa, única ou múltipla, evoluindo para pápulo-pustulosa, posteriormente úlcero-crostosa e finalmente assumindo o aspecto característico de úlcera de contornos circulares, bordas infiltradas, em moldura, indolor e fundo com granulações grosseiras. Pode ocorrer infecção bacteriana associada causando dor no local e produzindo exsudato seropurulento que ao dessecar-se em crostas recobre total ou parcialmente o fundo da úlcera. Adicionalmente, a infecção secundária e o uso de produtos tópicos podem causar eczema na pele ao redor da úlcera, modificando seu aspecto (forma ectimóide)^(34, 52, 62).

Outros tipos de lesões cutâneas menos frequentes podem ser encontrados. As lesões iniciais costumam ser nodular, localizadas profundamente na hipoderme, ou pequenas pápulas, semelhantes à picada de inseto, que evoluem aumentando em tamanho e profundidade (lesões papulo-tuberosas) e ulcerando no vértice. As lesões vegetantes caracterizam-se pelo aspecto papilomatoso, úmido e de consistência mole, enquanto que, as verrucosas caracterizam-se por superfície seca, áspera, com presença de pequenas crostas e descamação, estes dois tipos de lesões podem ser primárias ou evoluírem a partir de úlceras.

Ao redor da lesão principal, poderão surgir endureção subcutânea e pápulas satélites que coalescem formando placas. Novas lesões de leishmaniose cutânea (LC) podem surgir em áreas traumatizadas. A linfangite nodular, com ou sem linfadenopatia regional, quando presente, costuma estar recoberta por pele íntegra ou eritematosa (forma esporotricóide). Eventualmente, pode haver formação de úlceras no trajeto, porém, não é comum observar a formação de gomas, com supuração e fistulização das lesões. Caso não sejam tratadas, tendem à cura espontânea em período de alguns meses a poucos anos, podendo também permanecer ativas por vários anos e coexistir com lesões mucosas de surgimento posterior^(25, 34, 52).

As lesões cutâneas, ao evoluir para a cura, costumam deixar cicatrizes atróficas, deprimidas, com superfície lisa, áreas de hipopigmentação e traves fibrosas. Algumas vezes tornam-se hipertróficas, ou ficam despercebidas, por sua coloração, tamanho, forma ou localização, podendo permanecer ativas por vários anos.

A leishmaniose cutânea apresenta-se sob as seguintes formas clínicas:

Forma cutânea localizada (LCL)

Representa o acometimento primário da pele. A lesão é geralmente do tipo úlcera, com tendência à cura espontânea, apresenta boa resposta ao tratamento, podendo ser única ou múltipla (até 10 lesões). Todas as espécies de leishmanias, relacionadas ao comprometimento tegumentar, podem ocasionar a LCL, podendo haver diferentes prevalências entre

as espécies, de acordo com a região geográfica estudada. Na região Norte, as lesões múltiplas são frequentemente causadas por *L. (V.) guyanensis* e parecem estar relacionadas às múltiplas picadas de *Lu. umbratilis*. A forma localizada pode acompanhar-se de linfadenopatia regional e de linfangite nodular e costuma apresentar IDRMM positivo (Figuras 1 a 8).

Forma cutânea disseminada (LD)

É uma expressão clínica relativamente rara, que pode ser observada em até 2% dos casos de LT. Foi descrita em 1986 e desde então têm sido realizadas pesquisas que complementam as descrições clínicas com informação sobre suas características imunológicas e parasitológicas. As duas espécies reconhecidas como causadoras desta síndrome são *L. braziliensis* e *L. amazonensis*^(18, 23).

Esta forma é caracterizada por aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco, o número de lesões é variável >10 a centenas. A história natural da doença nestes pacientes inicia com uma ou várias lesões localizadas apresentando características clássicas de úlceras de fundo granuloso e bordas elevadas. A adenomegalia satélite observada em mais da metade dos casos da forma localizada, raramente é detectada nos pacientes com a forma disseminada e quando se apresenta é de aspecto discreto. Posteriormente, ao desenvolvimento da(s) lesão(ões) primárias, acontece um fenômeno, mais ou menos agudo provavelmente por disseminação do parasito por via hemática ou linfática, que se estabelece em poucos dias, às vezes em 24 horas, causando lesões distantes do local da picada.

Outros aspectos a serem destacados nesta forma clínica são: comprometimento mucoso concomitante que tem sido observado, em até 30% dos pacientes e manifestações sistêmicas, como febre, mal estar geral, dor muscular, emagrecimento, anorexia, entre outros (Figuras 9 a 10b). O encontro do parasito através de exames laboratoriais utilizados para diagnóstico, nesta forma clínica, é baixo, quando comparado com a forma difusa (LCD). Os pacientes apresentam títulos elevados de anticorpos séricos anti-*Leishmania*, resposta variável a IDRMM e à resposta linfoproliferativa "in vitro", que podem ser positivas ou negativas. Outro aspecto relevante no exame histopatológico é a presença de acometimento folicular que se correlaciona com a expressão clínica acneiforme. Em relação à resposta ao tratamento específico pode-se afirmar que apresenta resultados satisfatórios com o uso de (Sb⁺⁵) antimoniato-N-meglumina, embora a maioria dos pacientes requeira uma ou mais séries adicionais de tratamento para alcançar a cura clínica^(18, 23, 70).

Foram descritos pacientes vivendo com HIV/AIDS que apresentaram lesões disseminadas de LT. No entanto, ainda não foram relatados casos com todas as características clínicas da síndrome disseminada clássica descrita acima, predominando, nos indivíduos co-infectados, lesões ulceradas comprometendo vários segmentos corporais. De qualquer



Figura 1. LT - Lesão cutânea localizada em estágio inicial, com característica de placa infiltrativa (Observar nesta fase ausência de ulceração).



Figura 2. LT - Lesão cutânea localizada, ulcerada franca com bordas elevadas infiltradas e hiperemia ao redor - Estágio inicial da ulceração.



Figura 3. LT - Lesão ulcerada franca, única, pequena, com bordas elevadas infiltradas e hiperemia ao redor, fundo granuloso.



Figura 4. LT - Lesão ulcerada franca, única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas, fundo granuloso.



Figura 5. LT - Lesão em placa infiltrativa com bordas crostosa com áreas satélites de aspecto nódulo infiltrativo.



Figura 6. LT - Lesão em placa infiltrativa, com descamação central e hiperocrômia ao redor.



Figura 7. LT - Lesão cutânea múltipla, ulceradas, pequenas, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso.



Figura 8. LT - Lesão cutânea múltipla, ulceradas, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso com crostas no centro.



Figura 9a. Forma cutânea disseminada (LD): lesões cutâneas com aspecto verrucóide, bordas infiltradas, pequenas lesões nódulo crostosas satélites e em outras áreas da face.



Figura 9b. Forma cutânea disseminada (LD): Lesão na face posterior do tronco de aspecto nódulo verrucóide, com infiltração local e descamação.



Figura 10a. Forma cutânea disseminada (LD): Lesões em placas infiltradas extensas com crostas no local, algumas áreas com aspecto impetigóide e nódulo infiltrativo.



Figura 10b. Forma cutânea disseminada (LD): Polimorfismo lesional (nódulo infiltrativo, impetigóide, ulceradas pequenas) distribuídas na face posterior do tronco.

maneira, esta forma rara de apresentação pode alertar para a possibilidade da co-infecção *Leishmania*-HIV, tornando-se recomendável à investigação da infecção por este vírus⁽⁶⁰⁾.

Forma recidiva cútis (LRC)

O termo leishmaniose recidiva cutis (LRC) ou metaleishmaniose ou ainda leishmaniose lupóide caracteriza-se por presença de lesões nodulares, inicialmente isoladas, em seguida confluentes, em torno ou no interior da cicatriz de uma prévia lesão por *Leishmania*, de aparecimento tardio e de longa duração. É mais freqüente, em crianças, apresentando focos satélites no centro ou nas margens da área cicatrizada, estendendo continuamente seus limites. Pode evoluir também com cicatrização parcial da lesão cutânea, seja espontânea ou medicamentosa, aparecendo uma reativação localizada geralmente na borda da lesão. No Brasil temos relatos de casos

por *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. A resposta à terapêutica com os Sb⁺⁵ (Antimoniato-N-metilglucamina e estibogluconato de sódio) e também com as drogas de 2ª escolha (Anfotericina B e pentamidinas) é pobre ou ausente. A intradermoreação de Montenegro (IDRM) apresenta-se positiva⁽²¹⁾ (Figuras 11 a 14).

Forma cutânea difusa (LCD)

No Brasil, esta forma clínica é causada pela *L. (L.) amazonensis*. Constitui uma forma rara, porém grave, que ocorre em pacientes anérgicos, com deficiência específica na



Figura 11. Forma recidiva cútis (LRC): Lesão apresentando cicatrização central com bordas infiltradas em algumas áreas e lesões satélites ao redor.



Figura 12. Forma recidiva cútis (LRC): Lesão com cicatriz central, bordas infiltradas, lesões satélites com algumas crostas localizadas.



Figura 13
Forma recidiva cútis (LRC): Lesões com cicatrizes centrais, bordas infiltradas, lesões satélites com algumas crostas localizadas.



Figura 14

resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*^(21, 34, 70). Inicia de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento; evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrendo grandes extensões do tegumento cutâneo do corpo. A resposta à terapêutica é pobre ou ausente e geralmente a IDRМ apresenta-se negativa (Figuras 15 a 19).

De um modo geral na LCD, não ocorre comprometimento das mucosas, ou às vezes ocorre de modo discreto, havendo apenas infiltração da mucosa nasal por contiguidade. Raramente encontra-se relatos de destruição septal ou presença de pólipos nas mucosas labial e nasal^(16, 21, 53). Casos da forma “limítrofe” foram descritos, com presença de lesões mistas (úlceras e nódulos), que podem surgir espontaneamente ou ser induzidos por tratamento como os casos citados por Moriearty^(53, 57, 70).

Leishmaniose mucosa (LM)

Esta forma é particularmente importante na América do Sul, onde a principal espécie causadora é a *L. braziliensis*, embora, já tenham sido isoladas outras espécies de parasitas

(*L. amazonensis* e *L. guyanensis*)^(45, 46, 66). Nos países andinos as leishmanias mais freqüentemente isoladas são a *L. panamensis* e *L. guyanensis*⁽²⁹⁾. Os poucos casos registrados no Velho Mundo, são descritos no Sudão, e estão relacionados a áreas endêmicas de doença visceral (durante ou após a leishmaniose visceral), causada pela *L. donovani* e diferentemente da forma ocasionada na América do Sul, nunca é precedida ou acompanhada por lesões cutâneas, apresentando boa resposta clínica ao tratamento com os Sb⁺⁵⁽⁴¹⁾. Ainda no velho mundo, há registros de casos LM causados por *L. infantum*⁽⁵²⁾.

Caracteriza-se por apresentar aspectos de cronicidade, latência e por desenvolver metástases em mucosas que conduzem a quadros clínicos desfigurantes^(45, 46, 66). É de difícil diagnóstico parasitológico e a taxa de refratariedade ao tratamento com Sb⁺⁵ é significativa. Estudos de seguimento em pacientes com LC, curados após tratamento específico, mostram que entre 2 a 5% dos casos desenvolveram forma mucosa da doença após vários anos da cura da lesão inicial^(2, 45, 46). Conforme, demonstrado em alguns estudos, a recorrência da doença esta relacionada ao fato de que a *Leishmania* tem



Figura 15. Forma cutânea difusa (LCD): Lesão infiltrada com áreas descamativas na orelha.



Figura 16. Forma cutânea difusa (LCD): Polimorfismo lesional (Lesões em placas infiltradas, com exulceração, tubérculos em face, orelha e membro superior).



Figura 17. Forma cutânea difusa (LCD): Polimorfismo lesional (Lesões em placas infiltradas, exulceração, tuberculos, nódulos, deformidades nas extremidades).



Figura 18. Forma cutânea difusa (LCD): Lesões infiltradas com exulcerações em bordas (orelhas, nariz e lábio superior).



Figura 19. Forma cutânea difusa (LCD): Lesões vegetantes extensas no nariz e nódulo infiltrativa na face.

capacidade de persistir por muito tempo e até por toda vida no hospedeiro, mesmo após tratamento específico^(3, 68). Supõe-se que as metástases para mucosa sejam resultados de disseminação linfática ou hematogênica das formas amastigotas da pele para a região naso-orofaríngea, embora este mecanismo ainda não esteja bem esclarecido⁽²⁸⁾.

Llanos-Cuentas *et al.*⁽⁴²⁾ verificaram que pacientes com cicatrizes decorrentes de lesões cutâneas múltiplas e extensas, com duração prolongada e de localização acima da linha da cintura, possam estar associadas ao desenvolvimento de lesões em mucosas. Os achados de Nogueira & Sampaio⁽⁵⁶⁾ sobre este aspecto não apresentaram significância estatística.

Alguns estudos relataram os possíveis mecanismos envolvidos na patogênese desta forma clínica, parecendo estar envolvidos os alelos para os genes do fator de necrose tumoral α , β , e o papel das citocinas nas leishmanioses (IL4 e IL10)⁽⁷⁾. Contudo um adequado tratamento da LC, parece possibilitar a redução dos riscos de desenvolvimento da lesão mucosa⁽⁹⁾. A forma progressiva e mutilante da doença, parece estar relacionada a uma resposta imune hiperativa do hospedeiro^(9, 18).

ALM pode manifestar-se de forma atípica simulando outras doenças^(34, 66), e os raros relatos de acometimento do trato genital por esta forma clínica são decorrentes da lesão primária



Figura 20. Forma atrófico crostosa (LM).



Figura 22. Forma mutilante (LM).

da doença, com inexistência de casos relacionados a metástases^(17, 46, 52, 63). O aumento de casos de LM como infecção oportunista em pacientes imunocomprometidos vem sendo relatado^(31, 69).

Os aspectos epidemiológicos da LM não variam muito em relação à forma cutânea, sendo a população masculina freqüentemente acometida em vários estudos, atingindo com mais freqüência às faixas etárias economicamente ativas da população⁽⁶¹⁾. Não há predominância de cor, dada a grande miscigenação da população brasileira^(61, 70). A maioria dos casos relaciona-se à infecção cutânea anterior por leishmaniose, geralmente confirmada pela presença de cicatriz cutânea característica^(45, 62). Com relação à ocupação, tanto a LM como a LC têm em comum o fato de ser considerada por alguns autores doença de caráter ocupacional na Amazônia brasileira, uma vez que, a maioria dos pacientes são procedentes de áreas rurais com ocupações relacionadas à lavoura ou na floresta (agricultores, coletores de látex ou outros produtos naturais, topógrafos, geólogos, botânicos, caçadores e trabalhadores da engenharia de construção)^(34, 45, 46, 70).

Em relação à apresentação clínica da lesão mucosa a classificação proposta por Ribeiro & Lopes-Filho⁽⁶⁶⁾, parece ser prática em função de abordar aspectos relacionados à evolução da doença. Temos então:



Figura 21. Forma úlcero-destrutiva (LM).



Figura 23. Forma mutilante da cavidade oral (LM).

Infiltrativa

Na fase inicial da doença apresenta-se como hiperemia da mucosa septal, que histologicamente corresponde a um edema submucoso e uma vasodilatação, mantendo-se o epitélio íntegro. O processo inicia-se, na maioria das vezes, na área de Little, no septo ou em área de cornetos inferiores. Esta fase da doença pode passar despercebida, dificultando o diagnóstico ao ser confundida com outras doenças como: rinosinusites, vestibulite nasal ou outras doenças granulomatosas.

Atrófico-crostosa

Com formação de crostas na região septal e cornetos inferiores e médios, geralmente acompanhada de infecção secundária local. Esta forma pode advir da evolução natural da doença ou na vigência do tratamento específico instituído (Figura 20);

Úlcero-vegetante

Nesta forma o processo granuloso é caracterizado por crostas e exsudato amarelado. Inicia-se no septo nasal, estende-se para o vestíbulo nasal e conchas inferiores, sobe lateralmente até atingir as conchas médias, porém, sem ultrapassá-las, respeitando os limites do cavum;

Úlcero-Destrutiva

O processo infiltrativo aumenta progressivamente, tornando a mucosa nasal mais rígida e iniciando o aspecto

granuloso que evolui para lesões de aspecto ulcerado, recobertas por exsudato fibrinoso e crostas. A remoção das crostas denota um aspecto sangrante e doloroso da mucosa. Os sintomas de obstrução nasal, secreção nasal, dor local e epistaxe são freqüentes nessa fase da doença. As ulcerações podem atingir o vestíbulo nasal e lábio superior que fica edemaciado e deformado, lembrando paracoccidiodomicose^(21, 25). A cartilagem do septo nasal fica exposta e pode ocorrer necrose com perfuração, podendo atingir toda porção cartilaginosa (Figura 21).

Mutilante

Nesta fase, a evolução das lesões pode ocasionar a destruição parcial ou total da pirâmide nasal. A progressão da lesão pode levar à destruição do septo anterior e das porções laterais do vestíbulo nasal, havendo uma queda da ponta, dando o aspecto característico de “nariz de tapir”. Nesta fase a evolução das lesões pode levar à destruição parcial ou total da pirâmide nasal, nesta última, o tegumento cutâneo pode ser comprometido tão seriamente que acaba sendo destruído junto com as cartilagens alares e triangulares, respeitando a porção óssea, ficando o nariz reduzido às aberturas piriformes^(20, 49, 61) (Figuras 22 e 23).

Forma poliposa

O processo infiltrativo torna-se mais exuberante semelhante a um pólipos com superfície lobulada e base sésil. Geralmente é unilateral podendo surgir na região de mucosa septal ou no ponto de sua transição ou nos rebordos de perfurações, também pode evoluir projetando-se para fora da cavidade nasal⁽⁶⁶⁾.

Leishmaniose da cavidade oral

É acompanhada, ou não de lesão em mucosa nasal. Os achados mais freqüentes ao exame físico são: lesões do tipo infiltrativa e de aspecto granuloso que podem acometer lábios, mucosa gengivo-jugal, língua, úvula, amígdalas palatinas e pilares amígdalianos, faringe e laringe. Com sintomas de odinofagia, rouquidão e tosse as lesões comprometem faringe e laringe e no restante da cavidade oral ser percebida como uma lesão que não cicatriza⁽⁶⁶⁾, e até serem confundidas com neoplasia⁽¹⁾. Raros casos de envolvimento traqueal são relatados^(41, 45, 62).

As lesões em lábio superior representam a contigüidade da lesão nasal para a mucosa da cavidade oral. A pele do vestíbulo nasal apresenta-se hiperemiada e com lesões ulceradas recobertas por crostas, o lábio fica com aspecto túrgido e infiltrado. Na região de palato mole as lesões podem apresentar aspecto ulcerado, recoberta por granulação grosseira, septadas por sulcos mais profundos e parcialmente recoberta por fibrina, lembrando o aspecto de “doce de sagu”⁽⁶⁶⁾.

Após o tratamento clínico a mucosa nasal pode apresentar cicatriz atrófica de aspecto hipocrômico. Nas lesões de boca, podem surgir seqüelas funcionais importantes, a depender

do grau de envolvimento das estruturas da cavidade oral, tais como: destruição de palato mole, estenose e/ou insuficiência vélo-palatina, e estenose laríngea (Figura 23). Outras complicações já relatadas incluem otite média com efusão e dacriocistite crônica^(33, 41).

Diagnóstico da leishmaniose tegumentar

Para o diagnóstico tanto na LC como na LM, torna-se imprescindível um bom detalhamento dos aspectos clínico-epidemiológicos, exame físico adequado e avaliação otorrinolaringológica, além de exames complementares que podem auxiliar no diagnóstico, mas que devem ser interpretados com cautela em locais onde a LT é endêmica. Nos casos duvidosos é importante a realização de exames específicos para o isolamento e se possível a caracterização do parasita^(27, 29, 49).

Diagnóstico clínico-epidemiológico

Pode ser realizado com base nas características das lesões cutâneas e também na mucosa nasal e/ou oral, associadas a anamnese, onde os dados epidemiológicos são de grande importância. Para a lesão mucosa, deve-se levar em conta à infecção cutânea prévia por leishmaniose, presença de cicatriz compatível, o tipo e a duração do tratamento anterior. O diagnóstico clínico da LT pode ser difícil, dada a similaridade com outras doenças ou afecções que podem acometer a pele e também a mucosa. Portanto, torna-se importante fazermos o diagnóstico diferencial com algumas doenças, tais como: impetigo causado por bactérias, ectima, cromoblastomicose, úlceras/traumáticas e de estase, paracoccidiodomicose, Hanseníase, sífilis terciária, rinosporidiose, histoplasmose, granuloma de linha média, entomoforomicose cutâneo mucosa, rinoscleroma, sarcoidose, neoplasias, trauma local e inalação de cocaína^(1, 34, 45).

Exame físico

Todo paciente com lesão cutânea deve ser submetido também ao exame de mucosa nasal e orofaríngea, de modo a detectar o mais precocemente o envolvimento mucoso concomitante⁽⁵²⁾. Geralmente as lesões cutâneas e mucosas iniciais podem ser discretas e apresentar pouca sintomatologia, passando muitas vezes despercebidas ao doente. Na LM deve-se levar em conta os sinais e sintomas nasais crônicos persistentes (rinorréia, epistaxe, dor nasal, cacosmia)⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾.

Exames laboratoriais

Imunológicos: Intradermorreação de Montenegro (IDRM)

Empregado amplamente como método diagnóstico de rotina na confirmação de doença ativa, no diagnóstico retrospectivo e em inquéritos epidemiológicos de LT⁽⁴⁴⁾. A IDRM avalia a reação de hipersensibilidade tardia que ocorre na LT, e consiste tecnicamente na inoculação de 0,1mL de cultura de *Leishmania* mortas (antígeno padronizado) na face anterior do antebraço direito ou esquerdo com leitura após 48 horas, de acordo com a OMS⁽⁴⁹⁾. São consideradas positivas

as reações (endurações) ≥ 5 mm de diâmetro^(52, 59). As reações apresentam-se negativas (enduração < 5 mm de diâmetro) nos primeiros trinta dias após o início da lesão, em indivíduos imunodeprimidos, em caso de LCD, LD ou leishmaniose visceral (LV). Alguns autores observaram que pacientes com LM tendem a apresentar resposta exacerbada a IDRMM em relação aos pacientes com a LC^(2, 19). Segundo Marsden⁽⁴⁶⁾, este tipo de teste possui grande valor preditivo, com sensibilidade de 86 a 100% e especificidade de aproximadamente 100%, e recomendam sua utilização na prática clínica, podendo ser de grande valor em áreas onde a LT é endêmica, principalmente nos locais onde não existem outros métodos diagnósticos disponíveis. Nas áreas onde predomina a *L. amazonensis* a positividade pode ser mais baixa, além de relatos de reação cruzada em pacientes com doença de Chagas e indivíduos curados de LV.

É importante referir a dificuldade de interpretação dos resultados deste método, pois a IDRMM não diferencia doença atual de pregressa, visto que em pacientes que já foram diagnosticados e tratados de LT, este teste pode permanecer positivo a vida toda, assim como, em indivíduos sem doença, moradores de áreas endêmicas com exposição ao parasita⁽⁴³⁾. Segundo alguns autores, a resposta negativa da IDRMM está associada a um risco três vezes maior de recidiva após tratamento, demonstrando o valor do exame na avaliação prognóstica, indicando pacientes com maior risco de recidiva, mesmo após tratamento adequado^(33, 34, 61).

Sorológicos: reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Teste Imunoenzimático (ELISA)

Expressam o nível de anticorpos circulantes, sendo utilizados em centros de referência. Sua sensibilidade varia de 71%, nos casos de LC extensas e múltiplas, a 100% na LM⁽⁵⁰⁾.

Considera-se a RIFI positiva, a partir da diluição 1:40. A positividade deste exame está associada ao tempo de evolução da doença. Títulos elevados de IgG são encontrados em pacientes com mais de uma lesão (maior antigenicidade induzida pelo maior número de parasitas). Nos pacientes com lesões recentes (um a seis meses de evolução) é freqüente a negatividade sorológica. Em algumas espécies como *L. braziliensis* a sensibilidade da RIFI está em torno de 70% e na *L. guyanensis* a sensibilidade é menor. Após tratamento e cura, os títulos caem ou desaparecem em alguns meses. São relatadas reações cruzadas com a LV e doença de Chagas⁽²⁰⁾.

Exames parasitológicos

O encontro da *Leishmania* é o padrão-ouro para diagnóstico em todas as formas de leishmaniose. No entanto, na LM a escassez de parasitas dificulta sua visualização no exame histopatológico, método rotineiramente utilizado. Além disso, essas lesões são freqüentemente associadas a *L. braziliensis* que é uma espécie difícil de se isolar e manter em laboratório^(34, 52). Detalharemos os exames indiretos utilizados para o diagnóstico da LT⁽²⁰⁾.

Histopatologia

Os achados mais freqüentemente observados em amostras de biópsias cutâneas e mucosas são semelhantes, tais como: infiltrado celular do tipo linfo-plasmocitário, formação de granulomas, necrose e vasculite⁽¹²⁾. Os parasitas quando presentes, são encontrados em vacúolos intracitoplasmáticos de macrófagos ou nos espaços intercelulares, geralmente isolados. O diagnóstico de certeza pela histopatologia somente é dado quando se identifica o parasita nos tecidos, caso contrário às alterações histopatológicas, são no máximo, sugestivas do diagnóstico^(34, 52). A escassez de parasitas nas amostras de biópsia é comum, principalmente na LM^(7, 44). Nogueira & Sampaio⁽⁵⁶⁾, observaram a presença de amastigotas em 12,4% de lesões mucosas e 25,9% em lesões cutâneas. A sensibilidade da histopatologia pode ser explicada pela distorção e/ou redução de amastigotas durante o preparo da amostra de biópsia⁽³²⁾. Apesar deste método diagnóstico não apresentar alta sensibilidade, ela aumenta à medida que os tecidos obtidos forem de lesões recentes⁽¹²⁾.

O padrão histopatológico de lesões causadas por *Leishmania* não tem sido fácil de ser estabelecido, sendo que propostas de classificação foram utilizadas^(12, 39, 44). Magalhães *et al.*,⁽⁵¹⁾ analisaram o padrão histopatológico de 64 biópsias de pacientes com LM, classificando os resultados encontrados em quatro categorias: 1. reação exsudativa celular (75%); 2. reação granulomatosa exsudativa (11%); 3. reação exsudativa, necrótica e granulomatosa (9,3%); 4. reação exsudativa tipo granuloma tuberculóide (4,7%).

De acordo com a classificação proposta por Bittencourt & Barral⁽¹³⁾, as alterações histopatológicas encontradas em lesões de LC e LM podem ser definidas em três padrões de reação inflamatória: 1. reação exsudativa celular (REC); 2. reação exsudativa e necrótica (REN); 3. reação exsudativa e necrótico-granulomatosa (RNEG). Tais achados demonstraram aspectos histopatológicos distintos em diferentes lesões ou até na mesma lesão, sugerindo que o estágio histopatológico destas lesões não podem ser relacionadas ao prognóstico e à resposta terapêutica.

Botelho *et al.*⁽¹⁴⁾, demonstraram a evolução do processo inflamatório de lesões de pacientes com LC e LM, antes e após tratamento específico, classificando-a em 12 fases: 1) reação exsudativa; 2) reação exsudativa com células gigantes; 3) reação produtiva exsudativa (EPR); 4) reação produtiva com células gigantes (EPGCR); 5) reação exsudativa produtiva com reação necrótica (EPRN); 6) reação exsudativa necrótica (NER); 7) reação produtiva exsudativa (PER); 8) reação produtiva com células gigantes (PEGCR); 9) reação produtiva exsudativa com células gigantes (PEGCR); 10) reação produtiva exsudativa com células gigantes granulomatosas (PEGCGR); 11) reação produtiva (PR); 12) reação produtiva cicatricial (cura).

Imunohistoquímica (Imunoperoxidase)

Utiliza anticorpo policlonal anti-*Leishmania* apropriado, sendo um método de diagnóstico que aumenta

consideravelmente a sensibilidade e especificidade na detecção de formas amastigotas de *Leishmania* em amostras de biópsias quando comparada a histopatologia com a coloração hematoxilina & eosina (H&E), aumentando respectivamente a sensibilidade dos achados de 42% para 51% e a especificidade de 85% para 100%⁽³⁹⁾.

Cultivo de *Leishmania*

Permite a confirmação etiológica da *Leishmania* envolvida, que a depender da espécie cresce relativamente bem em meios de cultura, como o NNN e/ou LIT entre 24°C e 26°C, e após o 5º dia, já podem ser encontradas formas promastigotas do parasita. O meio mais empregado para o isolamento é o ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle (NNN) e suas modificações^(34, 52).

Ao contrário das espécies *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, a *L. braziliensis* comumente associada à LM é de difícil crescimento em meios de cultura, apresentando uma sensibilidade que varia de 40 a 50%. Além disso, o cultivo de formas promastigotas pode ser afetado pelo tipo de meio empregado (NNN ou LIT), o tipo de material utilizado (fragmento ou aspirado), o número de tubos de cultura ideal e a influência dos antissépticos empregados e à contaminação secundária por fungos e/ou bactérias^(6, 33, 67, 74).

Weigle *et al.*⁽⁷⁵⁾ e Navin *et al.*⁽⁵⁴⁾ demonstraram que a positividade de culturas feitas com aspirados de lesões cutâneas é maior do que quando se utilizam fragmentos dessas lesões, possivelmente devido às menores chances de contaminação secundária por fungo quando se utiliza a primeira técnica^(6, 67). A positividade da cultura também pode variar em relação ao número de tubos utilizados por lesão, conforme foi demonstrado por Navin *et al.*⁽⁵⁴⁾, que alcançaram 44% de positividade dos exames utilizando cinco tubos e Weigle *et al.*⁽⁷⁵⁾ encontraram 64,3% utilizando quatro tubos de cultura por lesão. Cuba-Cuba *et al.*⁽²⁷⁾ utilizaram apenas esfregaço das lesões, encontrando por este método 18,8% de exames positivos empregando apenas um tubo de cultura, aumentando a sensibilidade para 30,8% quando utilizaram três tubos. Os mesmos autores empregando o meio de Evans encontraram resultados inferiores, enquanto Hendricks & Wright⁽³⁶⁾, encontraram resultados satisfatórios (67%), utilizando o meio de Schneider.

Inoculação em hamsters (*Mesocricetus auratus*)

Os locais de preferência para inoculação são as extremidades, principalmente as patas posteriores ou focinho^(11, 34, 52). A inoculação para o isolamento de *Leishmania* é feita com material extraído de pacientes com lesões leishmanióticas (o triturado da biópsia ou aspirado da lesão), que segundo Barral *et al.*⁽⁶⁾ reduz os riscos de contaminação. Porém, este método é menos sensível do que a cultura *in vitro*, provavelmente porque um número mínimo de parasitas é necessário para estabelecer a infecção no animal^(15, 74). Navin *et al.*⁽⁵⁴⁾, utilizando o método de inoculação de aspirado encontrou resultados positivos menores (41,3%). Netto *et*

al.⁽⁵⁵⁾ obtiveram resultados satisfatórios no cultivo *in vitro* de *L. braziliensis*, do aspirado de lesões em hamsters utilizando diferentes meios de cultura, sendo o meio Agar Sangue Difco (DAB) eficiente no isolamento desta espécie.

As lesões no hamster desenvolvem-se tardiamente (dois a nove meses em média), e a eficácia do isolamento apresenta grande variação conforme a espécie de *Leishmania* envolvida, por isso esse método é reservado para pesquisas, pois é dispendioso e requer centro especializado^(34, 5 2).

Técnicas moleculares

Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Faz parte das modernas técnicas moleculares que permitem a análise direta de ácidos nucleicos, a partir da amplificação de um fragmento de agente infeccioso, cujas seqüências alvo para amplificação sejam conhecidas⁽⁴³⁾. Esse método molecular permite a caracterização dos isolados patogênicos, a nível de espécie, subespécies e cepas dos parasitas de *Leishmania*, através da análise molecular de minicírculos do kDNA^(10, 15, 43, 58, 63, 71).

Davies *et al.*⁽³⁰⁾, em estudo de revisão, avaliaram a sensibilidade diagnóstica do PCR em vários estudos sobre a LT, identificando 88% de precisão diagnóstica por esta técnica, quando comparado a outros métodos, como esfregaço (51%), cultura (47%) e o exame histopatológico (35%). Segundo estes autores, a sensibilidade do PCR aumenta quando os produtos amplificados são hibridizados, com sondas de DNA que permitam a identificação do subgênero ou espécie de *Leishmania*. Este dado foi comprovado por Aviles *et al.*⁽⁵⁾, quando utilizaram a técnica do PCR combinada com southern blotting, tendo a sensibilidade deste método aumentado para 93%, quando comparada ao PCR (83%) utilizado sozinho.

Além da grande sensibilidade diagnóstica do PCR, outras vantagens deste método são a rapidez com que pode ser realizado e a variedade de amostras que podem ser utilizadas para análise: biópsia congelada ou fresca, amostras fixadas em formol ou etanol, incluídas em blocos de parafina, aspirado de linfonodos, baço, medula óssea, e do sangue periférico^(5, 74, 65).

Weigle *et al.*⁽⁷⁵⁾ enfatizaram a aplicação do uso do PCR no diagnóstico de lesões crônicas causadas pela leishmaniose, visto que tais lesões, podem evoluir de forma atípica e serem confundidas com outras doenças, tais como câncer, lúpus, cromoblastomicoses e esporotricose. Além disto, a baixa quantidade de parasitas de *Leishmania* nas lesões crônicas, principalmente nos casos com mais de 6 meses de duração, diminui a sensibilidade do encontro destes protozoários pelos métodos laboratoriais convencionais^(26, 27, 49).

Outros autores enfatizaram o uso desta técnica molecular em lesões mucosas^(37, 48). Nestes casos, o método apresenta grande valor diagnóstico, pois geralmente são lesões de caráter crônico, em que a escassez de parasitas influencia na sensibilidade diagnóstica pelos métodos parasitológicos convencionais (histopatológico, e imunohistoquímica), enquanto que o isolamento destes parasitas em cultura e

através da inoculação em animais de laboratório requer centros de referência, é laborioso e representa altos custos, além de serem métodos demorados e poucos sensíveis nestas lesões. São poucos os relatos na literatura sobre o uso do PCR em pacientes com LM, com menos de 20 casos avaliados por esta técnica em cada estudo, o nível de sensibilidade e especificidade encontrado pelos autores variou de 80 a 90% e 90 a 100%, respectivamente^(43, 75). Guevara *et al.*⁽³⁵⁾, também utilizando a técnica de PCR, detectaram DNA de *L. (V) braziliensis* no sangue de paciente tratada de leishmaniose 30 anos após a cura clínica.

Abordagem terapêutica

A droga de primeira escolha para todos os tipos de leishmanioses é o antimonial pentavalente (Sb⁺⁵). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a dose de 10 à 20mg/Sb⁺⁵/Kg/dia, no Brasil, o Ministério da Saúde (MS) recomenda para o tratamento da LC a dose de 15mg/Sb⁺⁵/Kg/dia/20 dias e para a LM 20mg/Sb⁺⁵/Kg/dia/30 dias, se o tratamento não for suficiente repetir o esquema somente uma vez por mais 30 dias, para a LC e 40 dias para a LM⁽¹⁾. A dose recomendada para a LC é discutível, uma vez que, a frequência de recidivas em alguns estudos sugere o ajuste da dose para a mesma dosagem das LM^(24, 61). O efeito cardiotoxic, nefrotóxico, hepatotóxico desta droga implica que seja utilizada com cautela principalmente em pacientes acima de 40 anos de idade, devendo ser acompanhados com exames laboratoriais, pois a ocorrência de morte súbita por esta droga já foi relatada^(7, 45, 57, 59).

Quando não há resposta ao tratamento as drogas utilizadas como segunda escolha, são: anfotericina B, pentamidinas (isotionato e mesilato). Outras drogas são consideradas alternativas, como paramomicina (oral e tópica), alopurinol, cetoconazol, itraconazol, alopurinol + itraconazol⁽¹¹⁾. Bom resultado com o uso de isotionato de pentamidina vem sendo observado por autores no Amazonas para o tratamento da LC por *L. guyanensis* e *L. amazonensis*, visto que estas espécies têm apresentado altas taxas de insucesso com o Sb⁺⁵. Porém, esta droga deve ser usada com cautela, devido os efeitos diabetogênicos que pode ocorrer no curso do tratamento^(11, 16). Lessa *et al.*,⁽⁴¹⁾ observaram boa resposta terapêutica da LM refratárias quando usaram a associação de Sb⁺⁵ + pentoxifilina (possível ação anti-TNF α). Lambertucci *et al.*,⁽⁴⁰⁾ utilizaram a associação de claritromicina+Sb⁺⁵ (20mg/kg/dia) em intervalos intercalados de 7 dias por 8 semanas como opção terapêutica da LM associada à infecção rinossinal, com bons resultados. Na LC os índices de cura são elevados com o uso do antimonialato-N-metilglucamina (Glucantime[®]), enquanto que para a LM as recidivas são frequentes^(34, 45, 52). No entanto Marsden *et al.*,⁽⁴⁵⁾ observaram somente 2(2,6%) casos de recidivas em pacientes acompanhados com média de 4 anos após tratamento, reforçando que a dose e o tratamento adequado diminuem o risco de recidiva da doença.

Crítérios de cura

Os critérios de cura na LT são essencialmente clínicos^(34, 52, 60) e caracteriza-se pela cicatrização total das lesões após tratamento específico. No entanto, outros critérios podem ser considerados: parasitológico, histológico e sorológico^(15, 22). Em relação à LM considera-se curado clinicamente o paciente que após tratamento apresentar ausência de lesões granulomas ativas em mucosas ou presença de retração cicatricial em região de mucosa nasal e/ou oral (Ribeiro & Lopes-Filho, 1994)⁽⁶⁶⁾.

Referências

- Alliaga L, Cobo F, Mediavilla JD, Bravo J, Osuna A, Amador JM *et al.* Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: clinical and microbiologic findings in 31 patients. *Medicine*, Baltimore. 82:147-158, 2003.
- Almeida RP, Rocha P, Jesus AR, Costa J, Carvalho EM. Evaluation of cellular immune responses in patients with different clinical forms of tegumentary leishmaniasis. *Allergy Imm* 14:1-9, 1995.
- Amato VS, Duarte MI, Nicodemo AC, de Carvalho LV, Pagliari C, da Matta VL, *et al.* An evaluations of clinical, serologic, anatomopathologic and immunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 40:23-30, 1998.
- Andrade SL, Paes MG, Toledo LM, Romero GAS. Leishmaniose Tegumentar Americana em área de ocupação recente na periferia da cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil – fatores associados ao risco de infecção. *Rev Soc Bras Med Trop* 32(Supl.I):18-19, 1999.
- Avilles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR detection and identification of *leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Par* 85:181-187, 1999.
- Barral A, Almeida RP, de Jesus AR, Medeiros-Neto E, Santos IA, Johnson Jr. W. The relevance of characterizing *Leishmania* from cutaneous lesions a simple approach for isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 82:579-583, 1987
- Barral A, Barral-Neto M, Yong EC, Brownwill CE, Twardzink DR, Reed SG. Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc Nat Ac Scien USA*. 90:3442-3346, 1993.
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi JRG, Momen H, McMahon-Pratt D, Almeida R *et al.* Leishmaniasis in Bahia Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44:536-546, 1991.
- Barral-Neto M, Machado P, Barral A. Human cutaneous leishmaniasis advances in physiopatology and treatment. *Eur J Derm* 5:104-113, 1995.
- Belli A, Rodriguez B, Aviles H, Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 58:102-109, 1998.
- Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Inf Dis* 24:684-703, 1997.
- Bittencourt AL & Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 86:51-56, 1991.
- Bittencourt AL & Barral-Netto M. Leishmaniasis. In: Doerr W, Siefert G. (ed.), *Tropical Pathology*, Vol. 8, 2nd ed., Springer: Germany, 597-651p., 1995.
- Botelho ACC, Tafuri WL, Genaro O, Mayrinky W. Histopathology of human American cutaneous leishmaniasis before and after treatment. *Rev Soc Bras Med Trop* 31:23-27, 1998

15. Brujin MHL, Labrada LA, Smyth AJ, Santrich C, Barker DC. A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. *Trop Med Par* 44:201-207, 1993.
16. Bryceson, ADM. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia I. The clinical and histological features of the disease. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 63:708-737, 1969.
17. Cabello I, Caraballo A, Millán Y. Leishmaniasis in the genital area. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 44:105-107, 2002.
18. Carvalho EM, Barral-Neto M, Barral A, Broskyn CI, Bacellar O. Immunoregulation in leishmaniasis. *Ciência e Cultura J. Braz Assoc Adv Scien* 46:441-445, 1994.
19. Castes M, Agnelli A, Verde O, Rondon AJ. Characterization of the cellular immune responses in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Immunopath* 27:176-186, 1983.
20. Chiaromonte MG, Frank FM, Furer GM, Taranto NJ, Margni RA, Malchiodi EL. Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. *Acta Trop* 72:295-308, 1999.
21. Convit J, Kerdel-Vegas F, Gordon B. Disseminated anergic cutaneous leishmaniasis. *Brit J Derm* 74:132-135, 1962.
22. Costa JML, Lago EL, Magalhães AV, Marsden PD. Leishmaniose recidiva cútis causada por *Leishmania Viannia braziliensis*. *An Bras Derm* 71:329-333, 1996.
23. Costa JML, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC *et al.* Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil. A report of eight cases. *J Trop Med Hyg* 89:319-323, 1986.
24. Costa JML, Vale KC, França F, Saldanha ACR, Silva JOS, Lago EL, *et al.* Cura espontânea da leishmaniose causada por *Leishmania Viannia braziliensis*, em lesões cutâneas. *Rev Soc Bras Med Trop* 23:205-208, 1990.
25. Coutinho SG, Pirmez C, Mendonça SCF, Conceição Silva F, Doréa RCC. Pathogenesis and immunopathology of leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 82(suppl.): 214-228, 1987.
26. Cuba CC, Netto EM, Marsden OS, Rosa AC, Cuentas EAL, Costa JLM. Cultivation of *Leishmania braziliensis braziliensis* from skin ulcers in man under field conditions. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 80:456-457, 1986.
27. Cuba-Cuba C, Llanos-Cuentas EA, Barreto AC, magalhães AV, Lago EL, Reed SG *et al.* Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. I. Laboratory diagnosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 17:161-167, 1984.
28. Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in Infection by *Leishmania*. *Exp Mol Path* 72:132-141, 2002.
29. Cupolillo E, Grimaldi-Jr G, Momem H. A general classification of New World *Leishmania* zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 50:296-311, 1994.
30. Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodrigues N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad Saúde Pub* 16:925-950, 2000.
31. Dedet JP & Pratlong F. *Leishmania*, *Trypanosoma* and monoxenus trypanosomatidae as emerging opportunistic agents. *J Euk Microb* 47:37-39, 2000.
32. Dimier-David, Ravisse P, Bustillos R, Rollano F, Mallea F, David C *et al.* Histopathology of mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Ann Derm Ven* 21:387-392, 1994.
33. Escobar MA, Smith DS, Palma GI. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (tegumentary): A diagnostic challenge. *Trop. Doctor*, 22(suppl.1): 69-78, 1992.
34. Gontijo B & de Carvalho ML. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 36:71-80, 2003.
35. Guevara P, Ramirez JL, Rojas E, Scorza JV, González N, Ânez N. *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure. *Lancet*. 341:1341, 1993.
36. Hendricks L & Wright N. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by *in vitro* cultivation of saline aspirates in *Schneider's Drosophila medium*. *Am J Trop Med Hyg* 28: 962-964, 1974.
37. Izaza DM, Arboleda M, Restrepo M, McCann SHE, Barker DC. Validation of the polymerase chain reaction for the diagnosis of human cutaneous leishmaniasis in north-west Colombia. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 96(Suppl.1): S1/165-S1/168, 2002.
38. Jones TC, Johnson Jr. WD, Barreto AC, Lago E, Badaró R, Cerf B *et al.* Epidemiology of american cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Inf Dis* 56:73-83, 1987.
39. Kenner JR, Aronson NE, Brattbauer GL, Turnicky RP, Jackson JE, Tang DB, *et al.* Immunohistochemistry to identify leishmania parasites in fixed tissues. *J Cut Path* 26:130-136, 1999.
40. Lambertucci JR, Coulaud R, Silva LC. Mucosal Leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 36:307-308, 2003.
41. Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J *et al.* Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg* 65:87-89, 2001.
42. Llanos-Cuentas EA, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC, Campos M. Possible risk factors in development of mucosal lesion in leishmaniasis. *Lancet*. 4:295, 1984.
43. Lopez M, Ingá R, Cangalaya M, Eschevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, *et al.* Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg* 49:348-356, 1993.
44. Magalhães AV, Moraes MAP, Raick NA, Llanos-Cuenta EA, Costa JML, Cuba CC, *et al.* Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania b. braziliensis*. Padrões histológicos e estudo evolutivo das lesões. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 28:253-262, 1986.
45. Marsden PD. Mucosal Leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 80:859-76, 1986.
46. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis L(V)b* in Três Braços, Bahia-Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 27:93-101, 1994.
47. Marzochi MCA & Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthrozoosis and possibilities for their control. *Cad Saúde Púb* 10:359-750, 1994.
48. Medeiros ACR, Rodrigues SS, Roselino AMF. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 35: 421-424, 2002.
49. Mello MN, Mayrinky W, Costa CA, Magalhães PA, Dias M, Wilians P, *et al.* Padronização do antígeno de Montenegro. *Rev Inst Med Trop* 19:161-164, 1997.
50. Mendonça SCF, Souza WJS, Nunes MP. Indirect Immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 83:347-355, 1988.
51. Miles MA, Lainson R, Shaw JJ, Pova M, de Souza AA. Leishmaniasis in Brazil: XV. Biochemical distinction of *Leishmania mexicana amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis* and *L. braziliensis guyanensis* – aetiological agents of cutaneous leishmaniasis in the Amazon Basin of Brazil. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 75:524-529, 1981.
52. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, 182p. 2007.
53. Moriearty P, Bittencourt AL, Pereira C, Teixeira R, Barreto C, Guimarães NA. Borderline cutaneous leishmaniasis. Clinical, immunological and histological differences from mucocutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 20:15-21, 1978.
54. Navin TR, Arana FE, Merida AM, Arana BA, Castillo L, Silvers DN. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg* 42:36-42, 1990.

55. Netto EM, Cuba CC, Marsden PD, Barreto. El método de cultivo "in vitro" como instrumento práctico en el diagnóstico y el aislamiento primario del *Leishmania braziliensis braziliensis*. I. Observaciones de laboratorio. Rev Soc Bras Med Trop 19:79-84, 1986.
56. Nogueira LSC & Sampaio RNR. Estudo hospitalar da leishmaniose tegumentar americana (LTA): epidemiologia e tratamento. An Bras Derm 76:51-62, 2001.
57. Okelo GBA, Sang D, Bmatt KM. The treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis: report of two cases. East Afr Med J 68:67-68, 1991.
58. Oliveira CI, Báfica A, Oliveira F, Favali CBF, Correia T, Freitas LAR, et al. Clinical utility of Polymerase Chain Reaction-Based detection of Leishmania in the diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis. Clin Inf Dis 37:149-153, 2003.
59. Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-Cruz AM, Fernandes O, Moreira J, et al. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiological characteristics. Int J Derm 39:506-514, 2000.
60. OMS, Organização Mundial de Saúde. The Leishmaniasis and Leishmania/HIV co-infections. Disponível em: <http://www.who.int/inf-fs/em/fact116.html>. Acesso em 26 de Agosto de 2003.
61. Passos VMA, Barreto SM, Romanha AJ, Krettli AU, Volpini AC, Gontijo CMF, et al. Leishmaniose tegumentar na região metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos (1985-1995). Rev Soc Bras Med Trop 34:5-12, 2001.
62. Pessoa SB.- Classificação das leishmanioses e das espécies do gênero *Leishmania*. Arq Hig São Paulo. 26:41-50, 1961.
63. Premoli-de-Percoco G, Gonzalez N, Anez N, Guevara P, Ramirez JL. PCR detection of specific Leishmania-DNA in patients with periodontal disease. Path 94:28-31, 2002.
64. Rebêlo JMM. Flebótomos Vetores das Lesihmanioses. Manual para técnicos e profissionais da área de saúde. Universidade Federal do Maranhão/Ministério da Saúde, São Luís-MA, 32p, 2001.
65. Reithinger R, Lambson B, Barker DC, Davies CR. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia) spp.* in dog blood and bone marrow. J Clin Microb 38:748-751, 2000.
66. Ribeiro FAQ, Lopes Filho O. Doenças ulcerogranulomatosas em Otorrinolaringologia. In: Lopes Filho O, Campos CAH. *Tratado de otorrinolaringologia*. 1.ed., Rocca: São Paulo.71-75, 1994.
67. Romero GAS, Sampaio RNR, Macedo VO, Marsden PD. Sensivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 94:505-508, 1999.
68. Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, de Oliveira-Neto MP, Mattos Ms, et al. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American Tegumentary Leishmaniasis patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 96:987-996, 2001.
69. Silva-Vergara ML, Giraldo LER, Matos A, Curi VGM, Andrade FA. Paracoccidioidomicose juvenil associada à leishmaniose mucocutânea. Rev Soc Bras Med Trop 32(supl.I): 19-20, 1999.
70. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazon Brazil – A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 99:239-251, 2004.
71. Spithill TW, Grumont RJ. Identification of species, strains and clones of Leishmania by characterization of Kinetoplast DNA minicircles. Mol Bioch Par 12:217-236, 1984.
72. Talharai S, Arias JR, Cunha MGS, Naiff RD, Naiff MF, Freitas RA et al. Leishmaniose no Estado do Amazonas. Aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. An Bras Derm 63:433-438, 1998.
73. Tojal AC, Romero GAS, Cupolillo E. A diversidade das espécies causadoras de leishmaniose cutânea em Rio Branco-Acre, 2002. In: Anais do XXXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Belém-PA, 2003.
74. Uezato H, Hagiwara K, Maruno M, Oshiro M, Nakashima Y, Furuya M, et al. Comparative studies of the detection rates of Leishmania parasites from formalin, ethanol-fixed, frozen human skin specimens by polymerase Chain reaction and Southern blotting. J Derm 25:623-631, 1998.
75. Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR – based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. J Clin Microb 40:601-606, 2002.