



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS (Modalidade: Bacharelado)**

**HORTENCIA PEREIRA DA SILVA**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* E  
CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO INFECTADA: UM ESTUDO NA REGIÃO  
DE PINHEIRO-MA.**

**SÃO LUÍS/MA  
2023**

HORTENCIA PEREIRA DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* E  
CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO INFECTADA: UM ESTUDO NA REGIÃO  
DE PINHEIRO-MA.**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado à coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, como requisito necessário para obtenção parcial do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientadora: Dr<sup>a</sup> Mayara Cristina Pinto da Silva.**

**Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Mayara Ingrid Sousa Lima.**

**SÃO LUÍS/MA**

**2023**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Pereira da Silva, Hortencia.

Identificação molecular de espécies de Leishmania e caracterização da população infectada : um estudo na região de Pinheiro-MA / Hortencia Pereira da Silva. - 2023.

55 p.

Coorientador(a): Mayara Ingrid Sousa Lima.

Orientador(a): Mayara Cristina Pinto da Silva.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís-MA, 2023.

1. Diagnóstico molecular. 2. Epidemiologia. 3. Leishmaniose Tegumentar Americana. I. Pinto da Silva, Mayara Cristina. II. Sousa Lima, Mayara Ingrid. III. Título.

HORTENCIA PEREIRA DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* E  
CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO INFECTADA: UM ESTUDO NA REGIÃO  
DE PINHEIRO-MA.**

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Silvio Gomes Monteiro  
Universidade Federal do Maranhão

---

Me. Gustavo Henrique Corrêa Soares  
Universidade de São Paulo

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mayara Cristina Pinto da Silva  
Universidade Federal do Maranhão  
(Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mayara Ingrid Sousa Lima  
Universidade Federal do Maranhão  
(Coorientadora)

## DEDICATÓRIA

Aos meus queridos avós Sixto, Raimunda, Dionísio e Ivanilde (*in memorian*), obrigado de coração por terem acreditado no meu potencial, amo vocês eternamente.

Aos meus pais por toda confiança, amor, carinho e investimento em minha educação.

## AGRADECIMENTOS

Àquele que guia meus passos e ilumina meu caminho, meu eterno agradecimento a Deus. Sua graça e misericórdia têm sido a luz que me orienta nos momentos de desafio e triunfo.

Aos meus queridos pais, Francisco e Jacileide, e à minha amada irmã Helaine, não há palavras que possam expressar toda minha gratidão. Seu amor incondicional, apoio constante e encorajamento moldaram a pessoa que sou hoje. Cada conquista é um reflexo da base sólida que vocês construíram para mim. Obrigado por todo amor, carinho e investimento!

Ao meu namorado Jordan e sua família, vocês trouxeram ainda mais alegria e amor à minha vida. Agradeço por toda ajuda, por cada desafio superado juntos e por serem uma fonte constante de inspiração e apoio.

Agradeço à minha orientadora, Mayara Cristina Pinto da Silva, por ter me selecionado como sua orientanda para este projeto, obrigado por todo apoio e por todo conhecimento compartilhado.

Minha co-orientadora, Mayara Ingrid Sousa Lima, merece um agradecimento especial. Sua presença constante nos experimentos de laboratório e apoio nas etapas finais da monografia foram cruciais.

Aos amigos e colegas que fizeram parte dessa jornada, somente tenho a agradecer carinhosamente, em especial à Juliana Mendes Sousa, pois sua habilidade em ensinar os procedimentos de laboratório foi incrível, agradeço imensamente por toda ajuda, e também a Gustavo Almeida, obrigado aos dois pelas risadas, pelos momentos divertidos no laboratório e por todo apoio.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha trajetória acadêmica, meus mais sinceros agradecimentos. Esta conquista é resultado do esforço coletivo de pessoas incríveis ao meu redor.

Grata a todos por fazerem parte desta jornada extraordinária.

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é a forma mais comum de leishmaniose no Brasil, sendo *Leishmania (Viannia) braziliensis* a principal espécie causadora, com a presença adicional da espécie *L. (Leishmania) amazonensis*. O diagnóstico apropriado da LTA demanda a avaliação de parâmetros clínicos e epidemiológicos, seguida por ensaios laboratoriais para a confirmação. Neste contexto, as técnicas moleculares se destacam devido à sua elevada sensibilidade e especificidade. A PCR-RFLP emerge como um método preeminente no diagnóstico molecular de espécies de *Leishmania*, valendo-se de alvos moleculares específicos para a discriminação de espécies. Com isso, o objetivo principal desse trabalho foi determinar as espécies de *Leishmania* de amostras de pacientes com suspeita de LTA atendidos na Regional de Saúde de Pinheiro/MA, bem como realizar a caracterização clínico-epidemiológica da população estudada através de análise comparativa dos dados qualitativos (sexo, idade, escolaridade, entre outros) e dos dados de distribuição geográfica de todas as espécies de *Leishmania* identificadas no estudo para determinar os casos autóctones e importados. Ademais, também foi avaliada a correlação entre a técnica molecular (PCR) utilizada e o teste parasitológico direto, considerado o padrão ouro. A PCR da região do espaçador transcrito interno-1 (ITS1) detectou a presença de *Leishmania* em 24 amostras do total de 28 pacientes. A PCR-RFLP discriminou *L. (V.) braziliensis* como agente etiológico em 7 amostras, enquanto que *L. (L.) amazonensis* foi identificada em 14 amostras. Em nosso estudo, a maioria dos pacientes acometidos foram homens (N=20/71,43%), com faixa etária entre 18 a 35 anos (N=18/64,29%), de baixo nível de escolaridade (N=16/57,14%), residentes da zona rural (N=18/64,29%) e desempenhando a ocupação de garimpeiro (N=11/39,29%). A maior parte dos casos foi classificada como autóctone (N=17/60,71%), com a maior ocorrência de *L. (L.) amazonensis* no município de Pedro do Rosário (N=5/17,87%), seguido dos casos importados da Guiana Francesa que apresentaram ambas as espécies. Na avaliação da PCR ITS1, a positividade foi de 85,71%, e o índice Kappa foi de 0,22 demonstrando relação fraca entre o teste molecular utilizado e o padrão-ouro, sendo a PCR a técnica mais sensível (90,48%). Este estudo fornece dados epidemiológicos relevantes sobre *Leishmania* em Pinheiro/MA e regiões vizinhas, contribuindo para estratégias eficazes de controle da doença e, ainda, destaca a importância de testes moleculares como complementares ao diagnóstico.

**Palavras-chave:** Diagnóstico molecular; epidemiologia; leishmaniose tegumentar americana; PCR.

## ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis (ATL) is the most common form of leishmaniasis in Brazil, with *Leishmania (Viannia) braziliensis* being the main causative species, with the additional presence of the species *L. (Leishmania) amazonensis*. The appropriate diagnosis of ATL requires the evaluation of clinical and epidemiological parameters, followed by laboratory tests for confirmation. In this context, molecular techniques stand out due to their high sensitivity and specificity. PCR-RFLP emerges as a pre-eminent method in the molecular diagnosis of *Leishmania* species, using specific molecular targets for species discrimination. Therefore, the main objective of this work was to determine the species of *Leishmania* in samples from patients with suspected ATL treated at the Pinheiro/MA Health Regional, as well as to carry out the clinical-epidemiological characterization of the studied population through comparative analysis of qualitative data. (sex, age, education, among others) and geographic distribution data of all *Leishmania* species identified in the study to determine autochthonous and imported cases. Furthermore, the correlation between the molecular technique (PCR) used and the direct parasitological test, considered the gold standard, was also evaluated. PCR of the internal transcribed spacer region-1 (ITS1) detected the presence of *Leishmania* in 24 samples from a total of 28 patients. PCR-RFLP discriminated *L. (V.) braziliensis* as the etiologic agent in 7 samples, while *L. (L.) amazonensis* was identified in 14 samples. In our study, the majority of affected patients were men (N=20/71.43%), aged between 18 and 35 years (N=18/64.29%), with a low level of education (N=16 /57.14%), residing in rural areas (N=18/64.29%) and working as a miner (N=11/39.29%). Most cases were classified as autochthonous (N=17/60.71%), with the highest occurrence of *L. (L.) amazonensis* in the municipality of Pedro do Rosário (N=5/17.87%), followed by cases imported from French Guiana that presented both species. In the ITS1 PCR evaluation, positivity was 85.71%, and the Kappa index was 0.22, demonstrating a weak relationship between the molecular test used and the gold standard, with PCR being the most sensitive technique (90.48%). This study provides relevant epidemiological data on *Leishmania* in Pinheiro/MA and neighboring regions, contributing to effective disease control strategies and also highlights the importance of molecular tests as complementary to diagnosis.

**Keywords:** American cutaneous leishmaniasis. Epidemiology. Molecular diagnosis. PCR.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp.....	16
Figura 2: Ciclo de vida dos parasitos de <i>Leishmania</i> spp.....	17
Figura 3: Síndromes clínicas da LTA.....	18
Figura 4: Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> causadoras de LTA.....	19
Figura 5: Casos de LTA no Brasil em 2022 por UF de infecção.....	19
Figura 6: Prevalência e incidência de casos de LTA no Maranhão entre os anos de 2012 a 2022.....	21
Figura 7: Padrão de bandas na eletroforese da PCR-RFLP.....	24
Figura 8: Lesões cutâneas apresentadas pelos pacientes.....	31
Figura 9: Casos de LTA ordenados por município de notificação.....	33
Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 1% contendo os produtos de amplificação do DNA através da PCR do ITS1.....	34
Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 3% dos produtos da PCR digeridos com a enzima <i>HaeIII</i> (PCR-RFLP).....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas, clínicas, epidemiológicas e de tratamento dos pacientes de LTA atendidos na Regional de Pinheiro/MA.....	32
Tabela 2: Resultados dos testes laboratoriais e moleculares dos pacientes estudados.....	35
Tabela 3: Espécies de <i>Leishmania</i> encontradas através da PCR-RFLP ordenadas por município de notificação e local de provável infecção.....	36
Tabela 4: Comparação de positividade entre os métodos diagnósticos.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Do inglês “ <i>Bovine Serum Albumin Acetylated</i> ”
DHT	Hormônio andrógeno diidrotestosterona
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
Hsp70	Proteína de choque térmico 70
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
ITS1	Espaçador interno transcrito-1
kDNA	DNA do cinetoplasto
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
ng/ $\mu$ L	Nanogramas/ microlitro
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
rDNA	DNA ribossômico
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rpm	Rotações por minuto
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
$\mu$ L	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1 Aspectos gerais da leishmaniose tegumentar americana .....	15
2.2 Epidemiologia da LTA no Brasil e no Maranhão .....	18
2.3 Diagnóstico clínico-laboratorial e molecular da LTA .....	20
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>25</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
4.1 Objetivo geral.....	26
4.2 Objetivos específicos. ....	26
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	<b>27</b>
5.1 Considerações éticas .....	27
5.2 Caracterização do estudo .....	27
5.3.1 Critérios de inclusão. ....	27
5.3.2 Critérios de exclusão.....	27
5.3.3 Riscos.....	27
5.3.4 Benefícios. ....	28
5.4 Caracterização clínico-epidemiológica da população.....	28
5.5 Coleta de material e demonstração direta do parasito. ....	29
5.6 Identificação de espécies de <i>Leishmania</i> por métodos moleculares.....	29
5.6.1 Extração de DNA.....	29
5.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	30
5.6.3 Análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (PCR-RFLP).....	30
5.7 Avaliação dos métodos moleculares utilizados no diagnóstico.....	31
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
6.1 Caracterização clínico-epidemiológica da população estudada.....	31
6.2 Diagnóstico laboratorial e identificação de espécies de <i>Leishmania</i> utilizando PCR convencional e PCR-RFLP .....	35
6.3 Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> de acordo com o local provável de infecção... ..	37
6.4 Avaliação dos métodos diagnósticos. ....	38
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>
Anexo 1 .....	54
Anexo 2.....	56

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um grupo de doenças infecciosas complexas que afetam tanto seres humanos quanto animais de vida silvestre ou domésticos (FIOCRUZ, 2023). Essa doença é endêmica de regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil e o estado do Maranhão, sendo uma preocupação de saúde pública. A transmissão para seres humanos ocorre por meio da picada de flebotomíneos fêmeas, pequenos insetos vetores que pertencem ao gênero *Lutzomyia*. O ciclo de vida dos protozoários do gênero *Leishmania* é heteroxênico, ou seja, eles dependem de dois hospedeiros, um invertebrado que abriga as formas promastigotas do parasita, e o hospedeiro vertebrado, mantém as formas amastigotas intracelulares. (LAINSON; SHAW, 1978; BRASIL, 2017).

A leishmaniose apresenta duas formas clínicas: a leishmaniose tegumentar (LT) e a forma visceral (LV), sendo que a gravidade da doença é impactada pela espécie de *Leishmania* envolvida, bem como pela resposta imune do hospedeiro. No Brasil, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é a forma clínica mais prevalente, sendo *Leishmania (V.) braziliensis* a principal espécie causadora (BRASIL, 2017). Conforme apontado por Lainson e Shaw (1978), os primeiros casos de LTA no Brasil foram registrados entre 1909 e 1911, ocasionados por *L. (V.) braziliensis*, e outras também são reconhecidas como agentes etiológicos da LTA, incluindo *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) guyanensis*.

No Brasil, a leishmaniose cutânea localizada é a síndrome clínica mais comum de LTA, geralmente causada por *L. (V.) braziliensis*, caracterizada por lesões ulcerosas que podem cicatrizar espontaneamente ao longo do tempo. Estas lesões podem, em alguns casos, evoluir para lesões mucosas ou difusas. As lesões cutâneas difusas, uma condição rara, se apresentam como múltiplas lesões não ulceradas em várias regiões do corpo, sendo causadas principalmente por *L. (L.) amazonensis* (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). A leishmaniose mucosa ocorre quando o parasito se propaga nas mucosas do trato respiratório, digestivo superior e genitais. Essa forma é principalmente causada por *L. (V.) braziliensis*, frequentemente decorrente de uma leishmaniose cutânea, podendo também manifestar lesões cutâneas concomitantes. A leishmaniose disseminada, outra síndrome clínica, é caracterizada por lesões múltiplas que podem ser ulceradas, nodulares, papulares ou acneiformes, disseminando-se rapidamente devido à propagação do parasito nos sistemas linfático/hematogênico. As principais espécies causadoras dessa condição são *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017; SILVA, 2017). No Maranhão, o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) registrou cerca

de 17.854 casos de LTA de 2012 a 2022, resultando em uma taxa de prevalência de 263,50 casos por 100.000 habitantes, sendo que na regional de saúde de Pinheiro/MA, foram notificados entre os anos de 2018 e 2022 cerca de 477 casos (SINAN, 2023).

Para obter um diagnóstico preciso da LTA, é fundamental avaliar parâmetros clínicos e epidemiológicos, complementados por testes laboratoriais para confirmação, uma vez que diversas doenças apresentam sintomas semelhantes. A análise clínico-epidemiológica, embora valiosa, muitas vezes não é conclusiva, ressaltando a importância dos métodos de diagnóstico laboratorial (OLIVEIRA, 2022).

Recentemente, os ensaios moleculares têm ganhado destaque no diagnóstico da leishmaniose devido à sua alta especificidade e sensibilidade. Essas técnicas exploram alvos moleculares específicos de *Leishmania*, permitindo a identificação do gênero, subgênero e espécie. As características genômicas desse parasito, como a ausência de íntrons, cromossomos pequenos e densidade gênica elevada, tornam a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) uma opção valiosa, possibilitando a detecção de DNA mesmo em casos com baixa carga parasitária, fornecendo resultados rápidos e precisos. A PCR também permite a amplificação de várias amostras, como biópsias, fragmentos de lesões, sangue, entre outros, além da identificação de espécies em vetores e hospedeiros (TSOKANA *et al.*, 2014; CHICHARRO *et al.*, 2023)

Considerando as características dos municípios da Baixada e Litoral Maranhense que são atendidos pela Regional de Pinheiro/MA, a identificação das espécies de *Leishmania* contribui para compreender a epidemiologia da leishmaniose e desenvolver estratégias de controle eficazes. Além disso, como diferentes espécies de *Leishmania* podem causar a LTA, cada uma com variações em distribuição geográfica, patogenicidade e resposta ao tratamento, a identificação molecular se destaca auxiliando em investigações acerca do monitoramento da eficácia de alguns tratamentos, avaliação da resistência a medicamentos e auxilia na epidemiologia da doença.

O presente estudo, portanto, visa identificar as espécies de *Leishmania* em pacientes de Pinheiro/MA, utilizando a análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) e avaliar os testes diagnósticos utilizados. Além disso, busca caracterizar a população estudada em termos sociais, econômicos, demográficos e clínicos, proporcionando uma compreensão abrangente da leishmaniose tegumentar nesta região.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais da leishmaniose tegumentar americana

A leishmaniose tegumentar americana, também denominada LTA, é uma doença originária do Novo Mundo, cujos agentes etiológicos pertencem aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, que de acordo com a classificação proposta por Lainson e Shaw (1987) podem ser subdivididos em seções a partir do desenvolvimento do parasito no intestino do vetor. Parasitos pertencentes ao subgênero *Viannia* desenvolvem-se no intestino posterior do inseto vetor, enquanto que parasitos do subgênero *Leishmania* se desenvolvem nas porções anterior e médio no intestino (AKHOUNDI *et al.*, 2016). No entanto, é importante observar que, com o avanço das pesquisas que empregam análises moleculares em cepas de *Leishmania*, a classificação mencionada anteriormente já sofreu modificações (CARVALHO, 2018).

O principal transmissor da doença é um inseto flebotomíneo hematófago pertencente à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e, no Novo Mundo, inclui três gêneros: *Warileya*, *Brumptomyia* e *Lutzomyia*, sendo este último o de maior relevância médica, apresentando grande variedade de espécies e uma vasta distribuição, considerando sua maior ocorrência em regiões tropicais, podendo ser encontrados em regiões florestais da América do Sul e Central (BRASIL, 2017; AKHOUNDI *et al.*, 2016). No território nacional, identificam-se seis espécies predominantes de flebotomíneos, responsáveis pela transmissão da LTA, a saber: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia migonei* (BRASIL, 2017).

O ciclo de vida da *Leishmania* é classificado como heteroxênico, o que significa que esses parasitos dependem de dois hospedeiros para completar seu ciclo biológico, sendo o hospedeiro invertebrado, que abriga a forma promastigota do parasito, também conhecida como forma flagelada, e o hospedeiro vertebrado, que é infectado intracelularmente pelas formas promastigotas metacíclicas (Figura 1). Esse ciclo abrange uma variedade de animais, incluindo cães, roedores, primatas e outros, independentemente de serem de vida selvagem ou domesticada. Essa complexa interação entre os hospedeiros é crucial para a manutenção e a propagação do ciclo de vida da *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1978; BRASIL, 2017).

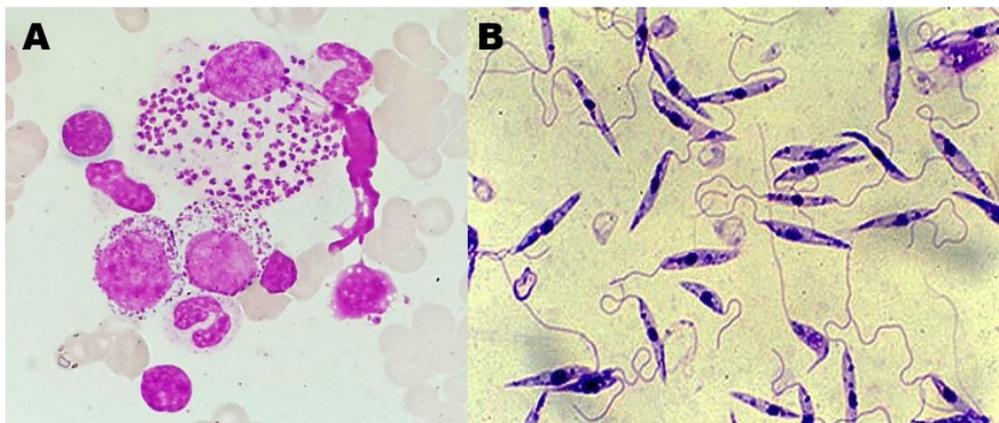


Figura 1: Formas evolutivas de *Leishmania* spp. A) Amastigotas parasitando macrófagos; B) Promastigotas.

Fonte: Saki e Pezeshki (2018) e Fiocruz (2009).

Devido ao seu ciclo de vida complexo, estes parasitos desenvolveram várias formas adaptativas às diferentes condições ambientais durante seu deslocamento entre o inseto vetor e o hospedeiro vertebrado, incluindo variações no pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes e oxigênio, assim, os parasitos diferenciam-se em formas altamente especializadas (Figura 2). Inicialmente, no interior do trato intestinal do inseto vetor, as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas. Posteriormente, essas promastigotas se multiplicam por divisão binária e transformam-se em promastigotas nectomonas, que ancoram no intestino médio do inseto. Devido à eliminação da maioria dos parasitas durante a defecação do sangue digerido, somente algumas promastigotas nectomonas subsistem para prosseguir no ciclo de vida. Estas passam por diferenciação, transformando-se em promastigotas leptomonas, onde se multiplicam e colonizam a porção anterior do intestino do flebotomíneo. Posteriormente, ocorre a diferenciação dessas promastigotas leptomonas em metacíclicas, que representam o estágio infeccioso da *Leishmania*. (STEVERDING, 2017; SERAFIM, *et al.* 2021). No entanto, uma pesquisa recente realizada por Serafim e colaboradores (2018) revelou uma fase adicional no ciclo de vida da *Leishmania*, resultante do processo de metaciclogênese reversa, conhecida como promastigota retroleptomona. Essa fase de desenvolvimento tem a capacidade de ampliar a presença de metacíclicos no intestino médio de flebotomíneos infectados por *Leishmania*, devido a desdiferenciação de promastigotas metacíclicos em retroleptomonas, favorecida pela ocorrência de múltiplas refeições sanguíneas (BATES, 2018; SERAFIM *et al.*, 2018).

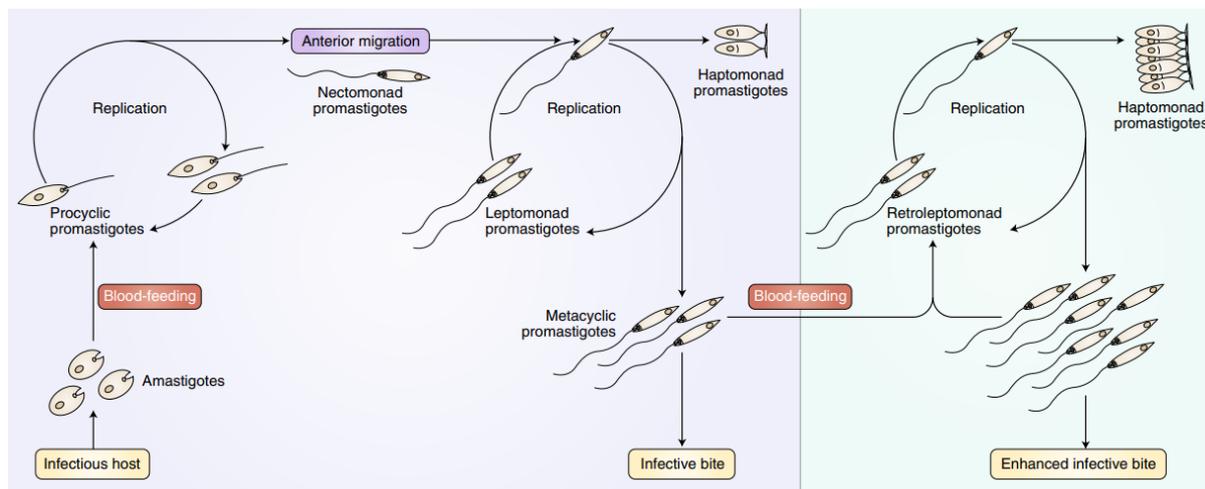


Figura 2: Ciclo de vida dos parasitos de *Leishmania* spp.

Fonte: Bates (2018).

Clinicamente, a doença manifesta-se de várias formas, sendo influenciada pela espécie de *Leishmania* infectante e também pela resposta imune do paciente. A leishmaniose cutânea localizada é a síndrome clínica mais comum no Brasil, sendo causada majoritariamente pela espécie *L. (V.) braziliensis*, caracterizando-se a partir de lesões ulcerosas, com bordas elevadas e fundo granuloso (Figura 3-A), e que podem cicatrizar espontaneamente ao longo do tempo (SILVA, 2017). Em alguns casos, pode haver o surgimento de lesões mucosas ou difusas devido a disseminação do parasito através das vias hematogênicas e/ou linfáticas (FURTADO, 1994). Lesões do tipo cutânea difusa geralmente apresentam-se como múltiplas lesões não ulceradas localizadas em várias regiões do corpo (Figura 3-B), é uma condição rara que evolui de lesões cutâneas não tratadas e possui como principais espécies causadoras no Novo Mundo: *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

A leishmaniose mucosa propaga-se pelas mucosas do trato respiratório, podendo afetar as mucosas do trato digestivo superior e até mesmo genitais (Figura 3-C/D) (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017); este padrão é causado principalmente por *L. (V.) braziliensis*, e na maioria dos casos é decorrente de uma leishmaniose cutânea, podendo também manifestar lesões cutâneas (SILVA, 2017). A leishmaniose disseminada é uma das formas clínicas de LTA caracterizada por lesões múltiplas que podem apresentar-se de forma ulcerada, nodular, papular e/ou acneiforme (Figura 3-E), propagando-se rapidamente devido a disseminação do parasito nos sistemas linfático/hematogênico (BENTES *et al.*, 2015). As principais espécies causadoras dessa condição clínica são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamanensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

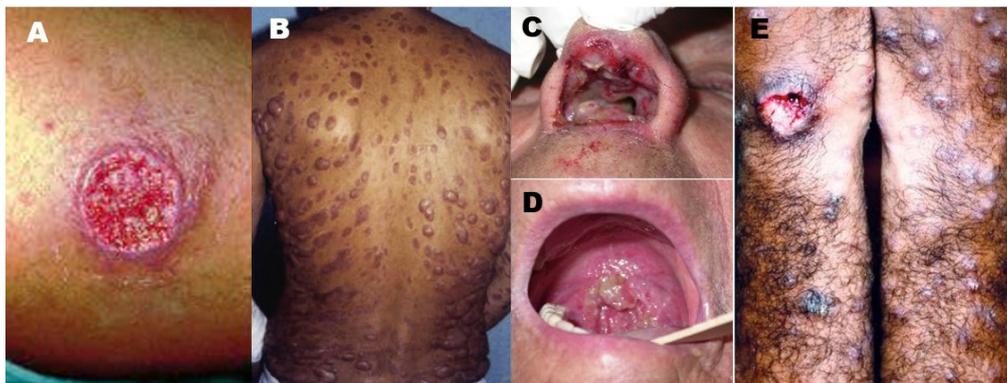


Figura 3: Síndromes clínicas da LTA.

Fontes: Fiocruz (2023); Torres-Guerrero *et al.* (2017); Calvopina *et al.* (2020); Machado *et al.* (2019).

## 2.2 Epidemiologia da LTA no Brasil e no Maranhão

No Brasil, a LTA é a forma mais comum, e sete espécies são encontradas no país, dentre as quais *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* são consideradas as de maior relevância clínica por ocorrerem em maior proporção (BRASIL, 2017). A Figura 4 apresenta a distribuição de espécies de *Leishmania* no Brasil, sendo possível observar que ocorrem diferenças entre as regiões do país, não somente quanto à ocorrência, mas também no que diz respeito ao perfil clínico dos casos, fatores de risco e questões socioeconômicas, tornando evidente a importância de estudos epidemiológicos para maior compreensão dos aspectos clínicos e distribucionais da doença, que auxiliam na consolidação de estratégias de prevenção, controle e monitoramento da leishmaniose (REGO *et al.*, 2023).

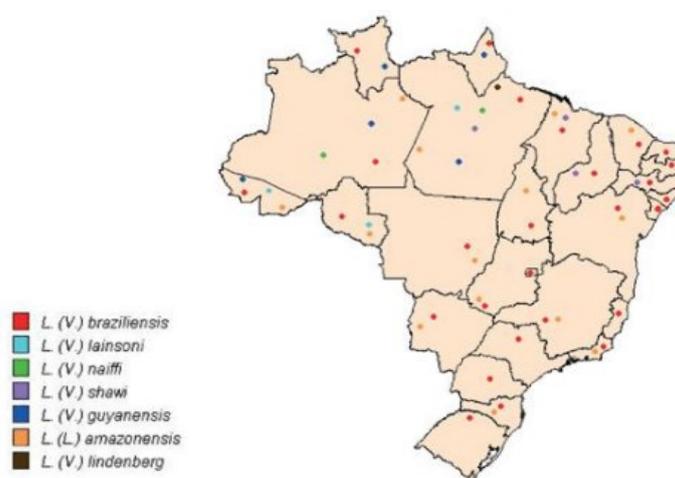


Figura 4: Distribuição das espécies de *Leishmania* que transmitem LTA.

Fonte: Brasil (2017).

Em 2022, no Brasil, foram notificados cerca de 14.305 casos de leishmaniose tegumentar, evidenciando uma grande ocorrência da doença, neste ano, em torno de 7 casos a cada 100.000 habitantes, segundo dados do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) e IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Observa-se na Figura 5 que a região Norte possui a maior quantidade de casos de LTA no país, porém alguns estados de outras regiões também destacam-se por apresentarem alta ocorrência de casos, como é o caso do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia e Maranhão (BRASIL, 2022).

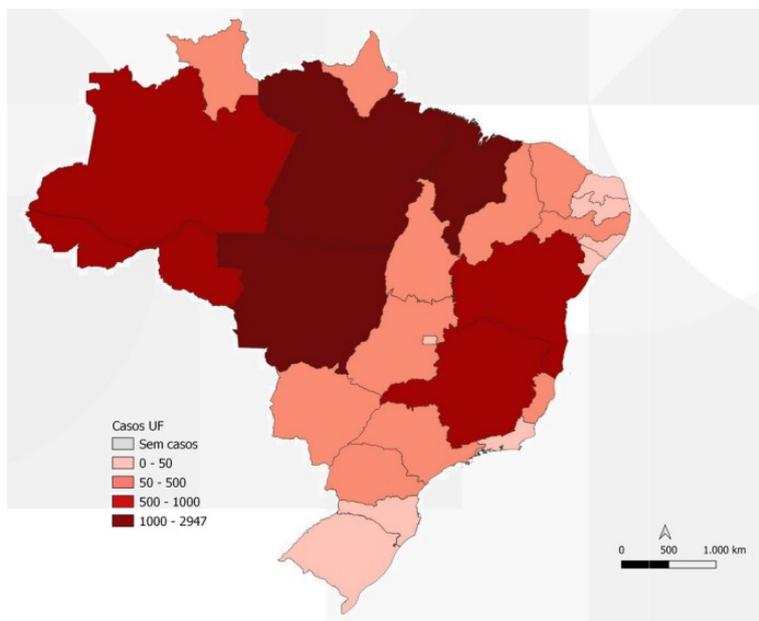


Figura 5: Casos de LTA no Brasil em 2022 por UF de infecção.

Fonte: SVSA/MS (2022).

Nesse contexto, o Maranhão se destaca na região Nordeste por apresentar altos índices de ocorrência da doença, e de acordo com dados do SINAN (2023), foram notificados no estado cerca de 17.854 casos de LTA entre os anos de 2012 a 2022, apresentando neste período, taxa de prevalência equivalente a 263,50 casos por 100.000 habitantes. Na Figura 6 é delineado o panorama epidemiológico dos casos de LTA no estado, baseado em cálculos de prevalência e incidência, conforme metodologia de Fletcher (2014). A análise desses dados permite afirmar categoricamente que, nos últimos três anos, ambos os parâmetros apresentaram um crescimento acentuado. Especificamente, destaca-se o aumento significativo na prevalência, sugerindo uma consolidação da presença da doença na população.

Ademais, é possível que outros fatores estejam contribuindo para esse aumento, tais como a redução na taxa de mortalidade e o acréscimo nas taxas de novos casos. Notavelmente, o aumento de casos novos evidencia uma relação direta de proporcionalidade entre prevalência

e incidência, visto que uma exerce influência sobre a outra. No que concerne ao aumento da incidência, diversos elementos podem estar desempenhando um papel nessa questão, incluindo o aumento na disseminação da doença, a manifestação de novos fatores de risco emergentes, deficiências nas medidas de prevenção, além de uma série de outros fatores sociodemográficos (FLETCHER, 2014).

A regional de saúde de Pinheiro, no estado do Maranhão, engloba mais de trinta municípios situados nas áreas da Baixada e Litoral maranhense. Durante o período compreendido entre os anos de 2018 e 2022, de acordo com dados do SINAN (2023), foram oficialmente registrados aproximadamente 477 casos nesta região. Desses, a maioria ocorreu em indivíduos do sexo masculino, totalizando 356 casos. Além disso, a faixa etária mais afetada situou-se entre 15 e 39 anos, com um total de 297 casos. Estes foram classificados como novos casos da doença, totalizando 454 notificações, evidenciando um constante fluxo de casos novos na região e, conseqüentemente, um aumento significativo nas taxas de incidência da doença. Em sua grande maioria, os casos diagnosticados apresentaram a forma cutânea, totalizando 402 ocorrências.

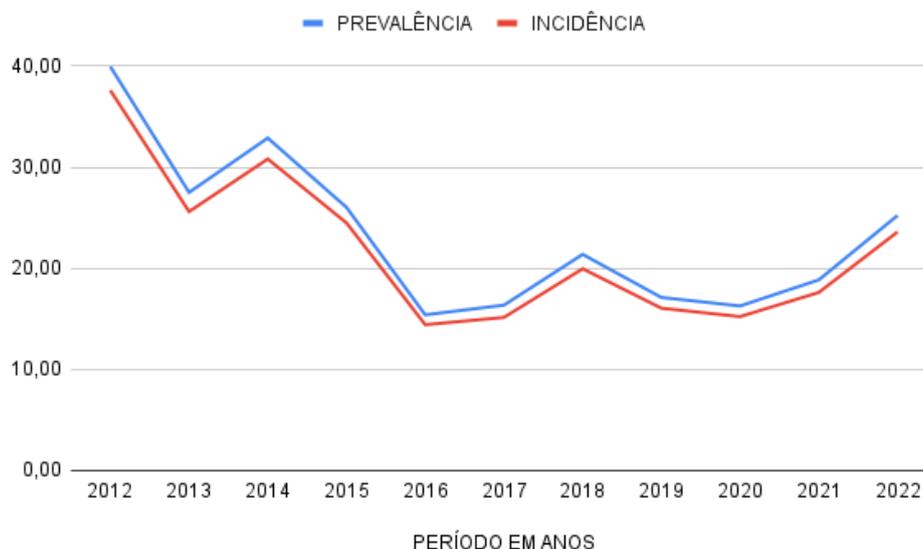


Figura 6: Prevalência e incidência de casos de LTA no Maranhão entre os anos de 2012 a 2022.

Fonte: Elaborado pela autora.

### 2.3 Diagnóstico clínico-laboratorial e molecular da LTA

No que concerne ao diagnóstico de LTA, é substancial não somente a avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos, mas também a aplicabilidade de testes diagnósticos

laboratoriais para confirmação da doença, posto que várias doenças apresentam sintomas e características similares à leishmaniose como a hanseníase, histoplasmoses, carcinomas e outras (OLIVEIRA, 2022). Além disso, tais métodos contribuem epidemiologicamente ao permitir a identificação das espécies de *Leishmania* em circulação (BRASIL, 2017). É importante destacar que esses testes apresentam diferentes níveis de especificidade e sensibilidade, influenciados pela qualidade dos equipamentos e materiais utilizados, assim como pelo estágio de progressão das lesões, as formas clínicas e as distintas espécies investigadas. Dessa forma, os testes laboratoriais utilizados no diagnóstico da LTA podem ser categorizados em quatro tipos: parasitológicos, imunológicos, sorológicos e moleculares (BRASIL, 2017).

Os exames parasitológicos têm como objetivo a detecção do parasito por meio dos principais métodos disponíveis: pesquisa direta, seguido de histopatologia que é um método de baixo custo, rapidez e facilidade de manipulação. Este método envolve a coleta de raspados da lesão e biópsias, corados com Giemsa e examinados microscopicamente para identificação das formas amastigotas de *Leishmania*, apresentando taxa de positividade de aproximadamente 43%, sendo que a sensibilidade é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão, pois passado um ano, é raro obter resultados positivos, e infecções secundárias podem reduzir a sensibilidade do teste (BRASIL, 2017); e o método de isolamento em cultura *in vitro* que abrange o uso de meios de cultura para cultivar material biológico, geralmente obtido por biópsia. Esse material é mantido a uma temperatura específica (24°C - 26°C) por cerca de um mês para permitir o crescimento do parasito, sendo depois verificada a presença do mesmo, porém, esse método não é adequado para unidades de saúde devido à necessidade de profissionais treinados, equipamentos e materiais caros, ambientes especializados para evitar contaminação, além do longo período para o crescimento do patógeno (LIMA, 2017).

O teste intradérmico de Montenegro (IDRM) é um tipo de teste imunológico essencial para diagnosticar a LTA em áreas endêmicas, baseando-se na resposta de hipersensibilidade celular tardia mediante a aplicação intradérmica de antígenos de *Leishmania* inativados (PINHEIRO, 2019). Embora seja capaz de detectar infecções subclínicas e oferecer alta confiabilidade diagnóstica após as primeiras semanas da lesão cutânea, existem considerações cruciais, podendo apresentar resultados negativos nas primeiras semanas, especialmente em lesões com mais de seis semanas, exigindo métodos diagnósticos adicionais, além disso, fatores como imunodepressão, lesões recentes, período de incubação e reações cruzadas podem resultar em falso-negativos (BENTES *et al.*, 2015; GONTIJO & CARVALHO, 2003; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015). Apesar de sua simplicidade e baixo custo, o IDRM não identifica espécies de *Leishmania*, não diferencia fases da infecção, e sua positividade pode persistir após

o tratamento. Nas formas mais graves, como a difusa, o teste pode ser negativo (BRASIL, 2017). Apesar das limitações, o IDRM desempenha um papel crucial no diagnóstico retrospectivo de lesões tardias, em que a detecção de parasitos é desafiadora por outros métodos.

Os testes sorológicos incluem a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Western Blot e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), e objetivam a detecção de antígenos ou anticorpos anti-*Leishmania* e também viabiliza a avaliação dos anticorpos IgM e IgG do paciente, a fim de comprovar a cura clínica, uma vez que os níveis destes anticorpos podem se manter estáveis ou diminuir no decorrer do primeiro ano após a cura, e um aumento quantitativo pode indicar a possibilidade de recorrência da doença (LIMA, 2017). Porém, estes testes possuem viés, como a probabilidade de haver reações cruzadas com outras doenças, reduzindo os índices de sensibilidade do teste. Semelhantemente ao observado na IDRM, há uma tendência de testes negativos realizados nos primeiros três meses de infecção, bem como em pacientes com a forma difusa da doença e em indivíduos imunossuprimidos (LIMA, 2017). Estudos vêm sendo realizados com o objetivo que reduzir as reações cruzadas com outras doenças por intermédio da descoberta de novos alvos de antígenos, utilizando proteínas recombinantes selecionadas que possuem maior especificidade em relação ao agente causador da doença, sendo que algumas dessas proteínas, como por exemplo, a tryparedoxina peroxidase, chega a apresentar sensibilidade e especificidade de até 100% (DUARTE *et al.*, 2015).

Embora a visualização microscópica de formas amastigotas seja considerada o método padrão para o diagnóstico da leishmaniose, as técnicas moleculares estão emergindo como uma alternativa mais eficaz, principalmente em amostras com baixa carga parasitária (CHICHARRO *et al.*, 2023), uma vez que apresentam alta sensibilidade e especificidade na detecção de DNA de *Leishmania*, possibilitando a distinção entre gêneros, subgêneros e espécies, através da utilização de alvos moleculares específicos de *Leishmania*, isso graças às peculiaridades genômicas presentes em seu DNA, como a ausência de íntrons, cromossomos pequenos com densidades gênicas elevadas, presença de policistrons e de uma única mitocôndria denominada cinetoplasto, contendo uma extensa cadeia de DNA cinetoplasmático (kDNA) (AKHOUNDI *et al.*, 2017).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) juntamente com os achados clínico-epidemiológicos torna possível o diagnóstico completo e eficaz de LTA. Esta técnica molecular possui aplicabilidade para vários tipos de amostras clínicas e sua eficácia é determinada por diversos fatores, como: o alvo selecionado para amplificação e o seu número de cópias (região alvo conservada ou variável), do método de extração empregado, do tipo de amostra biológica

(biópsias, fragmentos de lesões cutâneas e mucosas, sangue, entre outros) e do protocolo de PCR, se for ajustado ou elaborado (TSOKANA *et al.*, 2014). Estudo de Akhoundi *et al.* (2017) descreve vários alvos moleculares utilizados em ensaios de PCR para detecção de *Leishmania* em nível de gênero e espécie, dentre eles, os espaçadores internos transcritos (ITSs), regiões não codificantes dos genes rRNA, demonstram notável conservação entre diferentes espécies de *Leishmania*. A amplificação da região ITS1, localizada entre os genes que codificam o RNA da subunidade pequena e os genes 5.8S rRNA, oferece uma abordagem direta para identificação de parasitos de *Leishmania* em lesões clínicas. A utilização dos iniciadores LITSR / L5.8S permite a amplificação de tamanho variável de 50 a 350 pb da região ITS1 do DNA específico do gênero *Leishmania* (SCHÖNIAN *et al.*, 2003; MONROY-OSTRIA *et al.*, 2014; AKHOUNDI *et al.*, 2017).

Na literatura científica, é possível observar vários estudos realizados utilizando técnicas moleculares como a PCR ITS1 para identificação de *Leishmania* (SCHÖNIAN *et al.*, 2003; MOUTTAKI *et al.*, 2014; LIMA, 2019), demonstrando a importância que este teste apresenta em termos diagnósticos, visto que auxilia no entendimento do contexto epidemiológico da região estudada. Ainda, a técnica de análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) é utilizada para distinção entre as espécies de *Leishmania* através da utilização de enzimas de restrição, como a *HaeIII*, que gera fragmentos de restrição distintos com base em polimorfismos nucleotídicos (GONÇALVES, 2018). A PCR-RFLP do ITS1 é particularmente recomendada para a caracterização confiável de espécies de *Leishmania* em áreas endêmicas, onde a presença de múltiplas espécies de *Leishmania* é comum e se sobrepõe a diferentes quadros clínicos, sendo a identificação simultânea de espécies essencial nessas regiões, além disso, pacientes podem apresentar diferenças clínicas, gerando confusão no diagnóstico, com isso, o conhecimento acerca dessas espécies contribui para o controle e monitoramento da doença, bem como também para melhorar as abordagens no tratamento, ademais, esse método também oferece uma alternativa economicamente viável (MONROY-OSTRIA *et al.*, 2014; MOUTTAKI *et al.*, 2014).

Segundo os trabalhos de Monroy-Ostria *et al.* (2014), Godoy *et al.* (2020) e Jariyapan *et al.* (2021) é evidente que a distinção entre as espécies de *Leishmania* na PCR-RFLP é devido ao padrão de bandas apresentado na eletroforese, onde a tipagem para *L. braziliensis* é apresentada com duas bandas praticamente unidas, enquanto a espécie *L. amazonensis* demonstra duas bandas separadas (Figura 7).

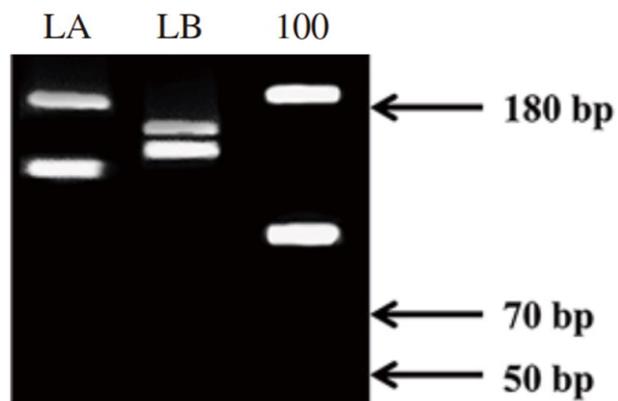


Figura 7: Padrão de bandas na eletroforese da PCR-RFLP. LA: *L. amazonensis*; LB: *L. braziliensis*; 100: marcador 100 pb.

Fonte: Adaptado de Godoy (2020).

### 3 JUSTIFICATIVA

Ao considerar as características dos municípios da Baixada e Litoral Maranhense que são atendidos pela Regional de Saúde de Pinheiro/MA, torna-se crucial a identificação das espécies de *Leishmania* que afetam a região, especialmente em locais onde diferentes formas clínicas da doença coexistem. Isso contribui significativamente para o entendimento da epidemiologia das leishmanioses e o desenvolvimento de estratégias de controle eficazes. Vale ressaltar que diferentes espécies de *Leishmania* podem causar a leishmaniose tegumentar americana e cada uma dessas espécies apresenta variações em termos de distribuição geográfica, patogenicidade e resposta ao tratamento, destacando a importância da identificação molecular para orientar o tratamento adequado. Além disso, a identificação molecular de *Leishmania* também desempenha um papel vital no monitoramento da eficácia do tratamento, na avaliação da resistência a medicamentos e na pesquisa sobre a epidemiologia da doença. A detecção de diferentes espécies de *Leishmania* em uma região geográfica pode indicar a presença de diferentes vetores ou reservatórios, o que pode influenciar as estratégias de controle da doença.

Com isso, este trabalho foi desenvolvido com o intuito de identificar as espécies de *Leishmania* de pacientes atendidos na Regional de Saúde de Pinheiro/MA através da aplicação da técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida da análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) para tipagem de espécies de *Leishmania*, além de avaliar os aspectos das técnicas diagnósticas empregadas utilizando cálculos como o índice Kappa para determinar o nível de concordância entre os testes. Também foi averiguado a distribuição das espécies encontradas de acordo com o local provável de infecção, determinando os casos que são autóctones do município de notificação e os casos importados, e foi realizada a caracterização da população estudada quanto a aspectos sociais, econômicos e demográficos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral.

- ❖ Identificar as espécies de *Leishmania* presentes em amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos na Regional de Saúde de Pinheiro/MA entre os anos de 2020 a 2022, utilizando a técnica molecular de PCR-RFLP.

### 4.2 Objetivos específicos.

- ❖ Avaliar as técnicas diagnósticas padrão-ouro e de PCR nas amostras de pacientes com LTA;
- ❖ Realizar a caracterização clínico-epidemiológica da população estudada quanto ao sexo, idade, grau de instrução, zona de residência e outras variáveis;
- ❖ Distribuir geograficamente as espécies de *Leishmania* identificadas, distinguindo os casos autóctones e os importados.

## **5 METODOLOGIA**

### **5.1 Considerações éticas**

Este estudo foi submetido à Plataforma Brasil sob o parecer N° 4.344.292 e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Os participantes da pesquisa foram submetidos a assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE) (Anexo I) após terem completamente compreendido os objetivos, riscos e benefícios do estudo, sendo assegurado o direito ao sigilo e à retirada da pesquisa a qualquer momento, sem qualquer tipo de prejuízo.

### **5.2 Caracterização do estudo**

Este trabalho envolveu a participação de 28 pacientes da Regional de Saúde de Pinheiro-MA, que foram submetidos a coleta de dados para estudo clínico-epidemiológico a partir da aplicação de questionário e subsequente coleta de amostras biológicas através da escarificação da borda da lesão, onde posteriormente foram devidamente armazenadas e encaminhadas para o Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGeM) da Universidade Federal do Maranhão em São Luís-MA, campus Bacanga.

### **5.3 Características da população estudada**

Participaram do estudo pacientes atendidos na Regional de Saúde de Pinheiro/MA diagnosticados clinicamente com leishmaniose tegumentar.

#### **5.3.1 Critérios de inclusão.**

Pacientes diagnosticados com leishmaniose tegumentar americana, de qualquer gênero, com idade igual ou superior a 15 anos e inferior a 70 anos, cadastrados na Regional de Saúde de Pinheiro/MA que receberam ou não tratamento.

#### **5.3.2 Critérios de exclusão.**

Foram excluídos do estudo, pacientes com comorbidades (diabetes, hipertensão arterial, neoplasias, imunodepressivos, etc.) e pacientes com leishmaniose em fase aguda ou grave, visto que estes necessitam de maiores cuidados, implicando em riscos adicionais para os participantes.

#### **5.3.3 Riscos.**

Como a coleta de material para demonstração direta do parasito compreende a escarificação das lesões, a pesquisa apresenta, aos seus participantes, os riscos próprios deste

procedimento como, desconforto, medo, dor, e em alguns casos, sangramento. A coleta será realizada por profissionais de saúde capacitados (profissional cadastrado na Regional de Saúde), em ambiente adequado (sala de coleta, com aparatos de curativo e antissépticos), treinados para tomarem as providências necessárias para sanar qualquer um dos eventos citados.

#### 5.3.4 Benefícios.

O benefício direto para o paciente é o possível diagnóstico correto de sua enfermidade, que leva imediatamente a tratamentos (já disponíveis) mais eficientes. A médio e longo prazo, o estudo desses pacientes levará a protocolos diagnósticos mais precisos e rápidos, e a tratamentos mais eficientes e personalizados. Além disso, o estudo contribuirá para a caracterização epidemiológica de pacientes com leishmaniose da região estudada, a educação continuada dos profissionais da saúde, assim como a contínua informação da população e órgãos do governo sobre os novos achados científicos relevantes para definir novas estratégias de saúde pública.

### **5.4 Caracterização clínico-epidemiológica da população.**

Para o estudo clínico-epidemiológico descritivo obteve-se dados dos pacientes mediante a aplicação de questionário disponibilizado pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (Anexo 2), incluindo 28 pacientes diagnosticados entre os anos de 2020 a 2022, com o principal objetivo de obter informações acerca da escolaridade, sexo, profissão, idade, naturalidade, local provável de infecção, entre outros.

As fichas de notificação dos agravos foram devidamente preenchidas nas Unidades Notificadoras correspondentes nos municípios e, posteriormente, encaminhadas à Regional de Saúde de Pinheiro-MA para serem devidamente integradas ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

A partir da obtenção desses dados, realizou-se a disposição de todas as informações em tabelas através do programa Microsoft Office Excel 2013, tendo sido realizados cálculos de frequência absoluta (N) e frequência relativa (%) para posterior discussão sobre a relação entre as variáveis estudadas. Além disso, para fins de análise comparativa serão apresentados dados de distribuição geográfica de todas as espécies de *Leishmania* identificadas juntamente com os dados de casos autóctones e importados de acordo com o local de provável infecção informado pelo paciente durante a aplicação do questionário.

## 5.5 Coleta de material e demonstração direta do parasito.

Com o intuito de obter uma amostra viável para um diagnóstico confiável, foram tomados os seguintes cuidados: o preparo do local de onde será coletado o material (úlceras recentes são mais ricas em parasitos), onde foi feita uma limpeza vigorosa do local da lesão com água e sabão, retirando-se resíduos de medicamentos ou outras substâncias, seguida de antissepsia com álcool a 70%. Quando necessário, utilizou-se um pequeno botão anestésico com lidocaína 1 ou 2%. Após a limpeza, foi realizada a escarificação da borda interna da úlcera ou da superfície de lesão fechada, utilizando-se lâminas de bisturi estéreis ou estilete. Uma parte das amostras foram submetidas a exame parasitológico de demonstração direta do parasito, tendo sido posicionadas em lâminas e fixadas com corante Giemsa para posterior visualização microscópica de amastigotas. As outras partes das amostras foram mantidas em frasco contendo 0,5mL de NET (NaCl 0,15mM; EDTA 50mM; Tris-HCl 0,1M/pH 7,5). Para assegurar a qualidade das amostras de pele/DNA extraído, foi mantido o controle diário de temperatura (2-8°C) em geladeira até o envio para o Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGeM) da UFMA - campus Bacanga.

## 5.6 Identificação de espécies de *Leishmania* por métodos moleculares.

### 5.6.1 Extração de DNA.

As amostras coletadas foram devidamente rotuladas seguindo o código de LC001 até LC0028, e armazenadas a - 20°C até a realização da extração. Para extração de DNA das amostras utilizou-se o método com fenol-clorofórmio (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989), processo que abrange três dias e envolve cuidados rigorosos para garantir a pureza e a integridade do DNA extraído. No primeiro dia, foram adicionados 200 µl de solução de lise celular, juntamente com 2 µl de proteinase K (20 mg/mL) a 500 µl da amostra biológica, tendo essa mistura sido vigorosamente vortexada por 20 segundos. As amostras foram colocadas em banho-maria a 42°C, e deixadas em incubação durante a noite para permitir a lise celular completa (overnight). No dia seguinte, as amostras foram retiradas do banho-maria e adicionou-se 200 µl de fenol (solução bifásica), sendo crucial a coleta apenas da fase inferior. Após vortexação por 20 segundos, a centrifugação a 10.000 rpm/15°C por 10 minutos separa as fases. O sobrenadante, contendo contaminantes como fenol e proteínas, é removido cuidadosamente, e as amostras são transferidas para novos tubos devidamente identificados, adicionando-se a estes 200 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24 µl de clorofórmio para 1 µl de álcool isoamílico). Uma nova vortexação precede a centrifugação a 14.000 rpm/15°C por 10

minutos. O sobrenadante é transferido para um novo tubo contendo 300 µl de álcool isopropílico, seguido de agitação por inversão 50 vezes. Realizou-se uma nova centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm/15°C, e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e os tubos foram invertidos sobre um papel absorvente. Com os tubos já secos, adicionou-se 300 µl de etanol 70% e 20 µl de acetato de sódio 3M. Após 15 inversões suaves, os tubos foram levados ao freezer a -20°C por 1 hora, e posteriormente foram centrifugados por 20 minutos a 14.000 rpm/15°C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado com uma pipeta e colocou-se os tubos para secar em papel absorvente. No terceiro dia, foram adicionados aos tubos 20 µl de solução TE e, então, armazenados -20°C. Posteriormente, utilizou-se um Espectrofotômetro NanoDrop® 2000 Thermo Scientific para determinar a concentração e qualidade do DNA em cada amostra, expressa em ng/µL.

#### 5.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para a PCR utilizou-se os primers F' (iniciador 5' ou forward) e R' (iniciador 3' ou reverse) do marcador molecular da região do ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1), com as sequências: LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'). Preparou-se o mix de amplificação contendo: 5 µl de 10x PCR Buffer, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1 µl de dNTP 10mM, 1 µl de Primer F' e 1 µl de Primer R', 0,2 µl de Taq polimerase e 13,3 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura, totalizando 23 µl para cada amostra, tendo sido utilizados 7 µl de DNA extraído com concentrações acima de 50 ng/µl, sendo o volume final de 30 µl. Os controles positivos utilizados foram de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8). A amplificação foi realizada em um termociclador de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto; 35 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94°C; anelamento por 30 segundos a 58°C; extensão por 40 segundos a 72°C, seguido de 1 minuto de extensão final a 72°C. Posteriormente, com o intuito de detectar a amplificação dos produtos de PCR, as amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (Ludwig Biotec) com os seguintes parâmetros: tempo de corrida de 40 minutos, 90v, 300 mA, sendo possível a visualização das bandas amplificadas através do transiluminador UV.

#### 5.6.3 Análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (PCR-RFLP).

Para identificação das espécies de *Leishmania*, os produtos de amplificação da PCR foram submetidos a PCR-RFLP, com o mix de reação contendo: 32,6 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura, 4 µl de Buffer C 10x (Promega 1mL), 0,4 µl de BSA (Bovine Serum Albumin Acetylated 150 µl) e

1 µl da enzima de restrição HaeIII (Promega), sendo um total de 38 µl de mix para cada amostra e 10 µl de produto de PCR, com volume final de 48 µl, e em seguida foram colocados em banho-maria a 37°C por 2 horas. Logo após, verificou-se a amplificação das amostras a partir da eletroforese em gel de agarose 3% (Ludwig Biotec) com os seguintes parâmetros: tempo de corrida de 60 minutos, 90v, 300 mA, e posterior leitura no transiluminador UV.

### **5.7 Avaliação dos métodos moleculares utilizados no diagnóstico.**

Foram realizados cálculos para avaliar a sensibilidade e especificidade do teste molecular de PCR convencional, envolvendo a determinação da percentagem de pacientes com resultados positivos nos testes parasitológico direto e PCR. Adicionalmente, o Índice Kappa (K) foi calculado utilizando o programa GraphPad Prism versão 10.1.1 para Windows com o propósito de mensurar a concordância entre os métodos diagnósticos empregados no contexto deste estudo. O nível de concordância do índice Kappa foi determinado de acordo com as interpretações desenvolvidas por Landis e Koch (1977), e é definido como: discordante ( $\leq 0,00$ ), mínimo (0,01 |- 0,20), fraco (0,21 |- 0,40), regular (0,41 |- 0,60), moderada (0,61 |- 0,80), substancial (0,81 |- 0,99), perfeita (1,00). Subsequentemente, os resultados foram tabulados no programa Microsoft Office Excel 2013 para possibilitar discussões fundamentadas acerca do que é relatado na literatura.

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 Caracterização clínico-epidemiológica da população estudada.**

Os dados colhidos nesta investigação sobre a leishmaniose tegumentar americana proporcionam uma visão abrangente e detalhada sobre os fatores demográficos, clínicos e epidemiológicos envolvidos na disseminação dessa doença parasitária (Tabela 1). Todos os pacientes deste estudo deram entrada como novos casos da doença e, clinicamente, foram diagnosticados com a forma cutânea da LTA, visto que os pacientes exibiam lesões ulcerosas com bordas elevadas e fundo granuloso, predominando em áreas específicas do corpo, como face, braços, mãos e pernas (Figura 8). Observa-se que dentre os pacientes, a faixa etária varia entre 19 a 65 anos, com uma média de  $33,36 \pm SD$  anos, destacando a ampla gama de idades afetadas, sendo a maioria dos casos concentrados entre os 18 e 35 anos (64,29%). Quanto ao gênero, há uma predominância de 71,43% (N= 20) de casos no sexo masculino em comparação com 28,57% (N= 08) no feminino.

Surpreendentemente, uma proporção significativa não informou o grau de instrução (N= 07/25%), enquanto 28,57% (N= 08) são analfabetos. Em relação à profissão, os dados revelam que a maioria dos casos está associada à ocupação de garimpeiros (N=11/39,29%), indicando uma possível ligação entre a doença e a ocupação profissional.

Em termos de zona de residência, a maioria dos casos é proveniente de áreas rurais (N= 18/64,29%), apontando para uma correlação entre a leishmaniose e localidades menos urbanizadas. O tratamento predominante, utilizado em 85,71% dos casos (N=24), foi o Glucantime. Quanto à evolução dos casos, 46,43% (N=13) resultaram em alta por cura, indicando uma resposta eficaz ao tratamento, porém, nota-se que na maioria dos casos notificados (N=15/53,57%) este parâmetro não foi informado.

A maioria dos casos (N=17/60,71%) é classificada como autóctone da região da baixada maranhense, sugerindo que a infecção ocorreu dentro da mesma área, contudo, também houveram pacientes que relataram outras localidades de provável infecção (N=11/39,29%) com ocorrência significativa na Guiana Francesa (N=9/81,82%), indicando áreas de alta transmissão, mais adiante estes resultados serão mais amplamente discutidos.

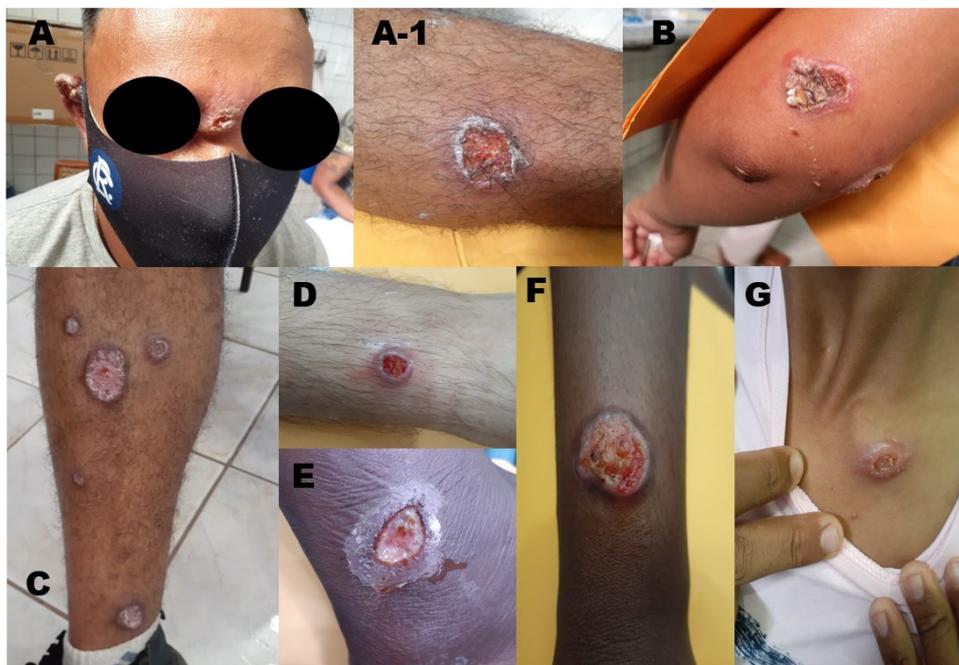


Figura 8: Lesões cutâneas apresentadas pelos pacientes.

Fonte: Regional de Saúde de Pinheiro/MA.

Tabela 1: Características demográficas, clínicas, epidemiológicas e de tratamento dos pacientes de LTA atendidos na Regional de Pinheiro/MA.

Variáveis	N	%
<b>Sexo</b>		
Masculino	20	71,43
Feminino	08	28,57
<b>Faixa etária (em anos)</b>		
18  - 35	18	64,29
36  - 53	07	25,00
54  - 69	03	10,71
<b>Grau de instrução</b>		
Analfabeto	08	28,57
Primário completo	05	17,86
Fundamental completo	03	10,71
Médio completo	04	14,29
Superior completo	01	3,57
Ignorado	07	25,00
<b>Profissão</b>		
Lavrador (a)	01	3,57
Pescador (a)	01	3,57
Garimpeiro (a)	11	39,29
Professor (a)	01	3,57
Ignorado	14	50,00
<b>Zona de residência</b>		
Urbana	10	35,71
Rural	18	64,29
<b>Classificação epidemiológica</b>		
Autóctone	17	60,71
Importado	11	39,29
<b>Medicação anti-<i>Leishmania</i></b>		

Glucantime	24	85,71
Anfotericina B	03	10,72
Não informado	01	3,57
<b>Doença relacionada ao trabalho</b>		
Sim	10	35,72
Não	09	32,14
Não informado	09	32,14
<b>Evolução do caso</b>		
Alta por cura	13	46,43
Não informado	15	53,57

Fonte: Elaborado pela autora

Os dados plotados no gráfico da Figura 9 apresentam a distribuição dos casos notificados de LTA em diferentes municípios, onde Pinheiro emerge como o epicentro de notificações neste estudo, concentrando cerca de 14 casos (50%); posteriormente, Pedro do Rosário aparece com uma representação significativa de 5 casos notificados (17,87), e os municípios de Turilândia e Apicum-açu seguem com 2 notificações cada; por último, as cidades que apresentaram somente 1 notificação são: Santa Helena, Bacuri, Guimarães, Palmeirândia e Presidente Sarney.

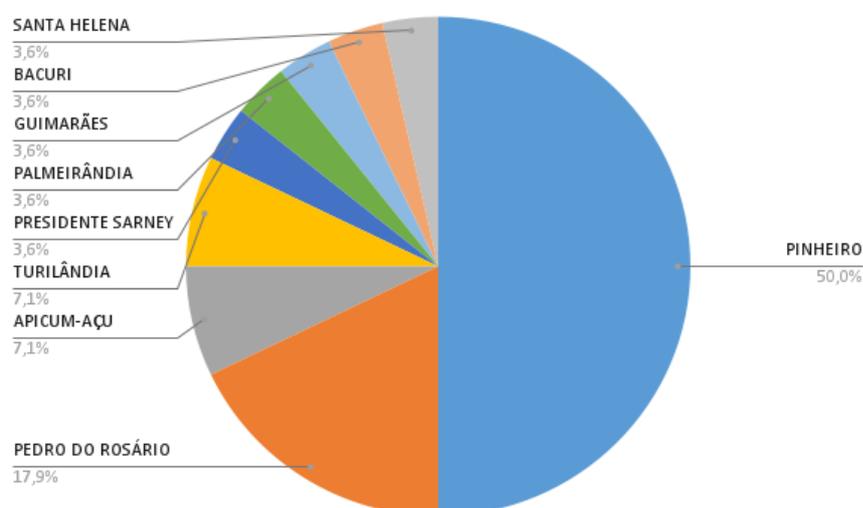


Figura 9: Casos de LTA ordenados por município de notificação.

Fonte: Elaborado pela autora.

## 6.2 Diagnóstico laboratorial e identificação de espécies de *Leishmania* utilizando PCR convencional e PCR-RFLP

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos dos exames de diagnóstico laboratorial e identificação de espécies de *Leishmania* por meio de técnicas moleculares, sendo possível observar os seguintes dados: 21 pacientes tiveram resultados positivos no parasitológico direto (75%); na histopatologia, foi observado resultado positivo em 19 pacientes (67,86%); a PCR ITS1 resultou positiva em 24 amostras (85,71%), e a eletroforese em gel de agarose 1% exibiu fragmentos com tamanho aproximado de 300 pb (Figura 10); já na PCR-RFLP foi possível identificar 2 espécies de *Leishmania* predominantes, 7 amostras para *L. braziliensis* e 14 para *L. amazonensis*, totalizando 21 amostras (75%) positivas na PCR-RFLP, sendo que a eletroforese em gel de agarose 3% revelou fragmentos de restrição com tamanhos variando entre 200-100 pb, e a comparação desses fragmentos com os padrões apresentados pelos controles positivos fornece a diferenciação entre as espécies de *Leishmania* (Figura 11). Das três outras amostras não tipadas, duas apresentaram bandas muito fracas que aparentemente parecem ser compatíveis com *L. amazonensis*, mas não podemos afirmar com certeza, e por isso optou-se por classificar como amostra não tipada.

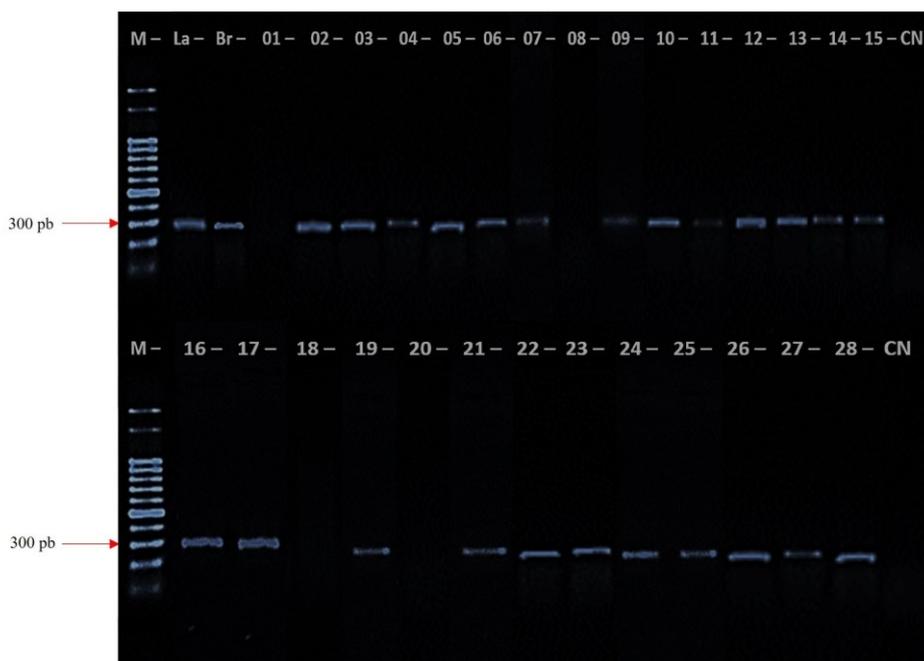


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 1% contendo os produtos de amplificação do DNA através da PCR do ITS1. M: marcador molecular 100 pb ladder (Ludwig Biotec).

Fonte: Elaborado pela autora.

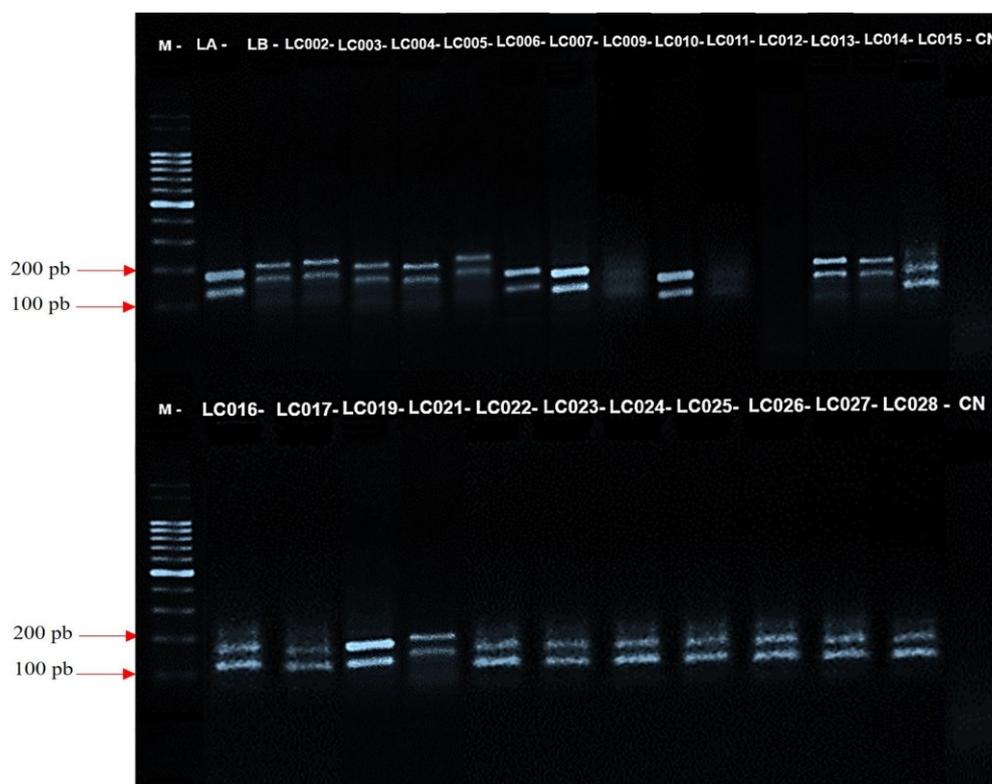


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 3% dos produtos da PCR digeridos com a enzima HaeIII (PCR-RFLP). M: marcador molecular 100 pb ladder (Ludwig Biotec). Controles positivos: La - *L. amazonensis*; Lb - *L. braziliensis*.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2: Resultados dos testes laboratoriais e moleculares dos pacientes estudados.

Pacientes	Parasitológico Direto	Histopatologia	PCR ITS1	PCR-RFLP
LC001	+	NC	-	NR
LC002	+	EP	+	<i>L. braziliensis</i>
LC003	+	EP	+	<i>L. braziliensis</i>
LC004	+	EP	+	<i>L. braziliensis</i>
LC005	+	EP	+	<i>L. braziliensis</i>
LC006	+	EP	+	<i>L. amazonensis</i>
LC007	+	EP	+	<i>L. amazonensis</i>
LC008	+	NC	-	NR
LC009	-	NR	+	NT
LC010	+	EP	+	<i>L. amazonensis</i>

LC011	-	NR	+	NT
LC012	-	NR	+	NT
LC013	+	EP	+	<i>L. braziliensis</i>
LC014	+	EP	+	<i>L. braziliensis</i>
LC015	-	NC	+	<i>L. amazonensis</i>
LC016	+	EP	+	<i>L. amazonensis</i>
LC017	+	EP	+	<i>L. amazonensis</i>
LC018	-	NR	-	NR
LC019	+	EP	+	<i>L. amazonensis</i>
LC020	-	NR	-	NR
LC021	+	EP	+	<i>L. braziliensis</i>
LC022	+	EP	+	<i>L. amazonensis</i>
LC023	+	EP	+	<i>L. amazonensis</i>
LC024	+	EP	+	<i>L. amazonensis</i>
LC025	+	EP	+	<i>L. amazonensis</i>
LC026	-	NC	+	<i>L. amazonensis</i>
LC027	+	EP	+	<i>L. amazonensis</i>
LC028	+	EP	+	<i>L. amazonensis</i>

Legenda: Positivo (+); Negativo (-); Não Realizado (NR); Encontro do Parasita (EP); Não compatível (NC); Não tipado (NT).

Fonte: Elaborado pela autora.

### 6.3 Distribuição das espécies de *Leishmania* de acordo com o local provável de infecção

Na Tabela 3 pode ser observado a relação dos municípios onde a LTA foi notificada e os locais prováveis de infecção segundo as espécies identificadas na PCR-RFLP, onde é possível evidenciar que a maioria dos casos é autóctone do município de notificação e que a espécie *L. amazonensis* possui alta ocorrência, mais a frente esta questão será discutida. Pedro do Rosário se destaca por apresentar 5 casos autóctones de pacientes infectados pela espécie *L. amazonensis*, demonstrando que essa espécie é circulante na cidade e sugerindo sua possível predominância em relação a outras espécies nesta região. Dentre os casos importados, destaca-se como possível local de infecção o território da Guiana Francesa que possui uma ocorrência

significativa de ambas as espécies de *Leishmania* encontradas, indicando uma diversidade de agentes etiológicos na área, além disso, embora apenas uma espécie tenha sido identificada, a detecção de *L. amazonensis* em um paciente proveniente de Boa Vista/RR destaca a mobilidade e a possibilidade de infecção em áreas geograficamente distantes, visto a migração de indivíduos que aumenta a disseminação da doença.

Tabela 3: Espécies de *Leishmania* encontradas através da PCR-RFLP ordenadas por município de notificação e local de provável infecção.

Município de notificação	Local provável de infecção	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. amazonensis</i>
Pinheiro	Guiana francesa	4	2
Pinheiro	Boa vista/RR	-	1
Pinheiro	Autóctone	1	-
Pinheiro	Autóctone	-	1
Pedro do rosário	Autóctone	-	5
Turilândia	Autóctone	-	2
Palmeirândia	Autóctone	-	-
Guimarães	Autóctone	1	-
Bacuri	Autóctone	-	1
Apicum-açu	Autóctone	-	1
Presidente Sarney	Autóctone	1	-
Santa helena	Guiana francesa	-	1
<b>TOTAL</b>		<b>7</b>	<b>14</b>

Fonte: Elaborado pela autora.

#### 6.4 Avaliação dos métodos diagnósticos.

De acordo com a Tabela 4 é possível observar que 19 pacientes foram positivos tanto no teste padrão-ouro quanto no exame molecular de PCR, estes, por sua vez, são considerados verdadeiros positivos. A maioria dos pacientes (N= 24/85,71%) apresentaram exame molecular positivo, enquanto que no exame parasitológico 75% (N= 21) das amostras foram positivas, evidenciando a alta positividade na PCR e sua eficácia no diagnóstico de LTA. Além disso, foram realizados cálculos para obter as porcentagens correspondentes a sensibilidade, especificidade e acurácia do teste, com os seguintes resultados: 90,48%, 28,57% e 75%, respectivamente. O índice Kappa apresentou concordância de 0,22 (IC= 95%), sendo considerado segundo as interpretações de Landis e Koch (1977) como um nível de concordância fraco, demonstrando que ambos os testes utilizados não possuem relação entre si.

Tabela 4: Comparação de positividade entre os métodos diagnósticos

<b>Exame Molecular PCR convencional</b>	<b>Parasitológico Direto</b>	
	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
<b>Positivo</b>	<b>19</b>	<b>5</b>
<b>Negativo</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

Fonte: Elaborado pela autora.

## 7 DISCUSSÃO

A análise dos dados desta investigação sobre a leishmaniose tegumentar americana em pacientes atendidos na Regional de Pinheiro/MA oferece uma perspectiva abrangente e detalhada sobre diversos aspectos demográficos, clínicos e epidemiológicos relacionados à disseminação dessa doença parasitária, não somente na região de Pinheiro, mas também em cidades próximas e até mesmo distantes, demonstrando a facilidade desta doença em se disseminar na população. Todos os participantes deste estudo receberam o diagnóstico de novos casos de LTA, manifestando predominantemente a forma cutânea da doença. Os resultados evidenciam um número significativo de casos entre o sexo masculino (N= 20/71,43%), em consonância com investigações anteriores sobre a leishmaniose, especialmente a revisão conduzida por Galvis-Ovallos *et al.* (2020), revelando que 74,2% dos casos de leishmaniose tegumentar notificados no ano de 2018, foram de indivíduos do sexo masculino. Essa correlação remete, sobretudo, às atividades laborais desempenhadas em ambientes de elevada transmissibilidade, como regiões silvestres, aliada ao papel tradicionalmente desempenhado pelo homem como provedor financeiro da família, expondo-o de maneira mais significativa a situações de risco, incluindo infecções.

Estudos também mostram que algumas respostas imunológicas específicas do sexo podem depender do genótipo masculino ou feminino, enquanto outras são influenciadas pelos hormônios sexuais, porém os estudos mais discutidos envolvem a investigação de esteroides sexuais que influenciam na infecção utilizando experimentos em animais, como exemplo, o trabalho realizado por Sánchez-García *et al.* (2018) que observaram uma maior propensão dos machos às infecções por *L. mexicana*, e investigaram o impacto provocado pelo hormônio andrógeno diidrotestosterona (DHT) nas formas promastigotas de *L. mexicana*. Seus resultados indicaram um aumento significativo no crescimento dos parasitas, na taxa de infecção de

macrófagos e na carga parasitária, além de mostrarem maior resistência ao ataque microbicida das células de defesa. Adicionalmente, camundongos BALB/c machos foram infectados com parasitas tratados com DHT, resultando em lesões maiores e com maior quantidade de parasitas por unidade de área em comparação com aqueles infectados com parasitas não tratados. De maneira global, esses achados sugerem que as interações entre hormônios sexuais, virulência do parasita, respostas imunológicas e suscetibilidade do hospedeiro são determinantes para o desfecho final da infecção por *Leishmania*.

No que diz respeito ao nível educacional, mais de 57% (N= 16) dos indivíduos possuem apenas o ensino fundamental completo, ressaltando a apreensão em relação à escassez de conhecimento sobre a doença. Essa questão é corroborada por estudos que evidenciam uma correlação entre a falta de informação sobre a enfermidade e níveis educacionais mais baixos, conforme exemplificado por Campos *et al.* (2017). Esta lacuna informacional representa um fator significativo, visto que a ausência de informações dificulta a redução da disseminação da doença, uma vez que as medidas preventivas não são devidamente conhecidas. Por este motivo, é necessário que haja mais iniciativas educativas direcionadas a comunidades com menor grau de instrução, desenvolvendo campanhas de conscientização com linguagem acessível, utilizando meios de comunicação em massa e abordagens interativas para garantir a compreensão efetiva. Nas escolas, programas de educação em saúde também desempenham um papel crucial, capacitando os indivíduos a reconhecerem os riscos, sintomas e medidas preventivas relacionadas à leishmaniose. Além disso, investir na formação de agentes de saúde locais pode facilitar a disseminação de informações de forma adaptada às realidades específicas de cada comunidade, e a promoção de parcerias entre setores governamentais, organizações não governamentais e instituições de pesquisa é fundamental para implementar abordagens abrangentes e sustentáveis no combate à desinformação sobre a leishmaniose.

No que concerne à distribuição etária, observou-se que a maior ocorrência de casos foi verificada em indivíduos pertencentes à faixa etária de 18 a 35 anos (64,29%), por outro lado, a população idosa demonstrou ser a menos afetada pela patologia em questão (N= 3/10,71%), esses dados corroboram com as diretrizes do Ministério da Saúde, onde jovens/adultos são os mais acometidos pela doença, visto que essa faixa etária corresponde ao período em que os indivíduos se encontram em fases de desenvolvimento produtivo, laboral e ocupacional, permanecendo por um intervalo prolongado em situações que propiciam maior exposição ao vetor transmissor da doença (BRASIL, 2017).

Conforme os resultados apresentados, observou-se que a categoria profissional mais afetada por casos de leishmaniose tegumentar é a de Garimpeiro, correspondendo a 11 casos

(39,29%). Dentre esses casos, nove pacientes atribuíram a origem de sua enfermidade ao exercício da profissão, sendo que um foi infectado em Boa Vista/RR e oito em garimpos na Guiana Francesa, evidenciando uma preocupação substancial devido às condições ambientais propícias à transmissão da doença em áreas específicas de atividade mineradora. A exposição constante a ambientes propícios para a proliferação do vetor, geralmente flebotomíneos, coloca os garimpeiros em risco aumentado de contrair a infecção. Adicionalmente, as condições precárias de saneamento, combinadas à ausência de medidas preventivas adequadas, podem contribuir para a disseminação da leishmaniose tegumentar nesse contexto (NASCIMENTO *et al.*, 2019). Os dados aqui apresentados corroboram com achados de outros estudos realizados em diferentes regiões, como na Bahia, Mato Grosso e em Oiapoque, município do estado do Amapá, limitado ao norte pelo território da Guiana Francesa (DOURADO *et al.*, 1989; OLIVEIRA, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2019), destacando que o contato frequente com áreas de mata, solo e água durante as atividades de garimpagem aumenta substancialmente a probabilidade de exposição aos vetores infectados.

Outro parâmetro que possivelmente contribuiu para os riscos de infecção é a zona de residência em áreas rurais, e neste estudo cerca de 64,29% (N= 18) dos pacientes vivem nessas regiões, constituindo um grupo particularmente suscetível à infecção por leishmaniose tegumentar, dada a natureza endêmica da doença em áreas de matas, florestas e com vegetação densa (LAINSON; SHAW, 1978). Ademais, fatores como a deficiência de infraestrutura sanitária apropriada em áreas rurais, a edificação de habitações de forma desordenada e sem planejamento adequado, associados a condições socioeconômicas desfavoráveis, podem contribuir para a falta de medidas preventivas eficazes (ARAÚJO, 2014).

Em relação à medicação anti-*Leishmania*, constatou-se que 85,71% dos casos (N= 24) foram submetidos ao tratamento com Glucantime<sup>®</sup>, e aproximadamente 45,83% destes pacientes (N= 11) alcançaram alta por cura, um dado corroborado por diretrizes e investigações prévias que atestam a eficácia desse medicamento no enfrentamento da doença (BRASIL, 2017; CAMPOS, 2017; BRASIL, 2021).

Preocupantemente, 13 pacientes (54,17%) não tiveram evolução do caso informado, assim como em outras variáveis como profissão (N= 14/50%) e doença relacionada ao trabalho (N= 9/32,14%), todas estas apesar de serem campos de preenchimento essenciais não obrigatórios, fornecem informações relevantes para a análise epidemiológica dos casos. A insuficiência de informações nas fichas de notificação foi analisada por Oliveira *et al.* (2022) em um estudo que avaliou a completude desses documentos provenientes da Regional de Saúde

de Pinheiro/MA entre os anos de 2017 a 2020, sendo possível identificar uma baixa taxa de preenchimento em diversas variáveis, dentre elas, a variável "ocupação" apresentou uma completude regular de 56,57%, seguida de "doença relacionada ao trabalho" que revelou uma completude ainda menor, atingindo 50%, enquanto a "evolução do caso" demonstrou uma completude significativamente baixa, alcançando apenas 14,65%. Nesse contexto, observa-se que o presente estudo também apresentou baixo nível de preenchimento dessas variáveis, que apesar de não serem obrigatórias, são campos cruciais em estudos epidemiológicos e sua ausência compromete substancialmente a qualidade das informações referentes à população afetada e suas condições de saúde, impactando diretamente na formulação de políticas de tratamento e controle da doença.

No que diz respeito à classificação epidemiológica, observa-se que a maioria dos pacientes contraiu a doença na região da baixada maranhense, representando 60,71% (N=17), enquanto 39,29% (N=11) dos casos foram registrados em outras localidades. A análise por PCR-RFLP identificou diferentes espécies de *Leishmania* em diferentes áreas de provável infecção, sugerindo a existência de distintas cepas ou fontes de infecção em várias regiões. Neste contexto, destacam-se 7 casos identificados como importados da Guiana Francesa, destes, 4 amostras testaram positivo para *L. braziliensis* e 3 para *L. amazonensis*, evidenciando uma presença notável de ambas as espécies, e indicando uma diversidade significativa de agentes etiológicos na área. No período de 2006 a 2013, um estudo realizado por Simon e colaboradores (2017), utilizou a técnica de PCR-RFLP para a identificação de espécies de *Leishmania* em 745 pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar no Hospital Geral de Caiena (LHUPM) na Guiana Francesa, e as proporções médias revelaram uma predominância de 86,2% para *L. (V.) guyanensis*, 9,7% para *L. (V.) braziliensis*, 2,8% para *L. (L.) amazonensis* e 1,3% para *L. (V.) lainsoni*. Além disso, os autores reportaram um aumento expressivo na ocorrência de *L. braziliensis* ao longo do período, passando de 8,9% em 2006 para 13% em 2013, e uma proporção maior de casos dessa espécie em áreas de garimpo, fato também evidenciado no presente estudo.

Outro dado relevante é em relação ao município de Pedro do Rosário, tendo sido notificados 5 casos que positivaram na PCR-RFLP como sendo da espécie *L. amazonensis*, evidenciando a predominância dessa espécie no município em questão, e sugerindo uma possível predominância dessa espécie na área. Portanto, a detecção desses casos sugere a importância de monitoramento contínuo, avaliação clínica dos pacientes e possível implementação de medidas para interromper a transmissão da doença, além de impulsionar mais estudos nesta região sobre os vetores e reservatórios envolvidos.

Quanto ao diagnóstico clínico-laboratorial da doença na população em estudo, inicialmente, foram empregados métodos laboratoriais de exame parasitológico direto, seguidos de histopatologia para a detecção do parasito. Estas técnicas são consideradas padrão-ouro no diagnóstico da LTA na Regional de Saúde de Pinheiro/MA. Nesse contexto, 21 pacientes (75%) apresentaram resultados positivos no exame parasitológico direto, e foram identificados amastigotas de *Leishmania* em 19 amostras (67,86%). Nos testes moleculares, a PCR ITS1 revelou-se positiva em 24 amostras (85,71%), enquanto na PCR-RFLP, 7 amostras (25%) evidenciaram positividade para *L. braziliensis* e 14 para *L. amazonensis*, sugerindo uma presença mais acentuada desta espécie entre os indivíduos infectados.

A predominância de *L. amazonensis* entre os pacientes com resultado positivo para RFLP contradiz achados de estudos em diversas regiões do país (RODRIGUES *et al.*, 2002; SILVA, 2017; CARVALHO, 2018;). Essa discrepância é notável, pois *L. braziliensis* é a espécie preponderante no território brasileiro (BRASIL, 2017). A predominância de *L. amazonensis* neste estudo pode ser atribuída a múltiplos fatores, incluindo o aumento da proliferação do vetor específico dessa espécie, no caso, o flebotomíneo *Lutzomyia flaviscutellata*. Este inseto é caracterizado como estritamente silvestre, com baixa antropofilia, hábitos alimentares predominantemente noturnos e ocorre principalmente em florestas residuais baixas, geralmente úmidas e de difícil acesso para os seres humanos (LAINSON, 1985). Portanto, são necessários estudos para validar essa hipótese, contribuindo assim para a compreensão da maior circulação de *L. amazonensis* na região e dos fatores envolvidos nesse evento.

Na análise dos testes diagnósticos implementados no presente estudo, evidenciou-se uma elevada taxa de positividade no exame molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (N= 24 / 85,71%). Isso corrobora a notável sensibilidade desta técnica em comparação com o padrão-ouro empregado na Regional de Saúde de Pinheiro/MA. A PCR demonstrou a capacidade de diagnosticar casos não identificados pelo parasitológico direto, ressaltando sua eficácia na detecção da presença do parasito. Resultados similares foram corroborados por estudos prévios (MACHADO, 2004; MOUTTAKI, 2014; SILVA, 2017). Contudo, a constatação de que 19 pacientes apresentaram resultados positivos em ambos os testes enfatiza a importância de empregar dois métodos diagnósticos. Neste contexto, a PCR revelou-se de extrema relevância no diagnóstico da doença, funcionando como um complemento valioso ao padrão-ouro já utilizado na Regional de Saúde. Essa abordagem dual fortalece a robustez diagnóstica e a confiabilidade dos resultados obtidos. No que concerne ao índice Kappa, foi observado um nível de concordância fraco ( $K=0,22$ ; IC=95%) entre os dois métodos utilizados,

sugerindo uma associação não significativa entre os testes. Esse achado está em consonância com os resultados do estudo de Assis (2010), que empregou amostras sanguíneas de cães diagnosticados com leishmaniose visceral para conduzir a PCR, além de utilizar métodos diagnósticos adicionais, como a pesquisa direta do parasito. No referido estudo, assim como no presente, o índice Kappa indicou uma concordância fraca, atribuída provavelmente à elevada positividade da PCR na detecção do parasito. O autor ressalta a importância de exercer cautela, uma vez que a PCR identifica exclusivamente o DNA de *Leishmania* e não constitui um diagnóstico direto da doença, sendo utilizado como um teste complementar ao diagnóstico clínico-laboratorial.

## 8 CONCLUSÃO

- Na PCR-RFLP, foram identificadas 7 amostras tipadas para *L. braziliensis* e 14 para *L. amazonensis*;
- A PCR do ITS1 possui maior positividade e sensibilidade se comparado com o padrão-ouro;
- Houve maior ocorrência da doença no sexo masculino, faixa etária entre 18|-35 anos, baixa escolaridade, correlacionada às atividades laborais em garimpos e áreas rurais de alta transmissibilidade;
- A maioria dos casos importados vieram da Guiana Francesa e constatou-se uma alta ocorrência de *L. amazonensis* em Pedro do Rosário.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, Alberon Ribeiro de. **Fatores de risco associados à leishmaniose tegumentar americana em área endêmica do estado de Pernambuco, Brasil**. 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

ASSIS, Juliana de; QUEIROZ, Nina Marí Gual Pimenta de; SILVEIRA, Rita de Cássia Viveiros da; NUNES, Cárís Maroni; OLIVEIRA, Trícia Maria Ferreira de Sousa; NORONHA JUNIOR, Antonio Carlos Faconti de; NEVES, Maria Francisca; MACHADO, Rosangela Zacarias; BUZETTI, Wilma Aparecida Starke. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 17-25, mar. 2010.

AKHOUNDI, Mohammad; KUHLS, Katrin; CANNET, Arnaud; VOTÝPKA, Jan; MARTY, Pierre; DELAUNAY, Pascal; SERENO, Denis. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 00-00, 3 mar. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>.

AKHOUNDI, Mohammad; DOWNING, Tim; VOTÝPKA, Jan; KUHLS, Katrin; LUKEŁ, Julius; CANNET, Arnaud; RAVEL, Christophe; MARTY, Pierre; DELAUNAY, Pascal; KASBARI, Mohamed. *Leishmania* infections: molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects Of Medicine**, [S.L.], v. 57, p. 1-29, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>.

BENTES, Aline Almeida; RODRIGUES, Daiana Elias; CARVALHO, Elaine; CARVALHO, Andréa Lucchesi; CAMPOS, Flávia Alves; ROMANELLI, Roberta Maia de Castro. Leishmaniose tegumentar americana: um desafio diagnóstico na prática pediátrica. **Revista Médica de Minas Gerais**, [S.L.], v. 25, p. 83-87, 2015. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/2238-3182.20150100>.

BONFIM, Natanael Endrew Souto Maior Torres; SCOTT, Ana Lígia Barbour; CALDERON, Leonardo de Azevedo. Leishmaniasis: Molecular Aspects of Parasite Dimorphic Forms Life Cycle. **Leishmaniasis - General Aspects Of A Stigmatized Disease**, [S.L.], 13 abr. 2022. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.102370>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Tegumentar 2022**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/situacao-epidemiologica/arquivos/lt-graficos-e-mapas.pdf>. Acesso em: 08 out. 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 7. ed. Santa Catarina, 2021. 75 p. Disponível em: [http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/GUIA\\_MS\\_vigilancia\\_](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/GUIA_MS_vigilancia_). Acesso em: 16 out. 2023.

CALVOPINA, Manuel; JIJON, Sara; SERRANO, Esteban; KATO, Hirotomo. Case Report: successful treatment with miltefosine of severe new world mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis*. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 103, n. 2, p. 752-755, 5 ago. 2020. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.19-0867>. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/103/2/article-p752.xml>. Acesso em: 02 out. 2023.

CAMPOS, Soraya Sena; CAMPOS, Fleming Sena; GOIS, Glayciane Costa; SILVA, Tiago Santos. Perfil epidemiológico dos pacientes com leishmaniose tegumentar americana no município de Ilhéus – Bahia. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, [S.L.], v. 38, n. 2, p. 155-164, 6 dez. 2017. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2017v38n2p155>.

CARVALHO, Bruna Caroline Vêras de. **Aspectos imunológicos e moleculares correlacionados às manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar americana**. 2018. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

CHICHARRO, Carmen; NIETO, Javier; MIGUELAÑEZ, Silvia; GARCIA, Emilia; ORTEGA, Sheila; PEÑA, Ana; RUBIO, Jose Miguel; FLORES-CHAVEZ, Maria. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis in Spain: development and validation of ready-to-use gel-form nested and real-time PCRs to detect *Leishmania* spp. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 11, n. 3, 15 jun. 2023. **American Society for Microbiology**. <http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.03354-22>.

DOURADO, Maria Inês Costa; NORONHA, Ceci Vilar; ALCANTARA, Neusa; ICHIHARA, Maria Yuri T.; LOUREIRO, Sebastião. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do Estado da Bahia (Brasil). **Revista de Saúde Pública**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 2-8, fev. 1989. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-89101989000100002>.

DUARTE, Mariana C.; PIMENTA, Daniel C.; MENEZES-SOUZA, Daniel; MAGALHÃES, Rubens D. M.; DINIZ, João L. C. P.; COSTA, Lourena E.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, Miguel A.; LAGE, Paula S.; BARTHOLOMEU, Daniela C.; ALVES, Maria Julia M.; FERNANDES, Ana Paula; SOTO, Manuel; TAVARES, Carlos A. P.; GONÇALVES, Denise U.; ROCHA, Manoel O. C.; COELHO, Eduardo A. F. Proteins Selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an Immunoproteomic Approach with Potential. **Clinical And Vaccine Immunology**, [S.L.], v. 22, n. 11, p. 1187-1196, nov. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.00465-15>.

FIOCRUZ. **Leishmaniose**. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/doenca/leishmaniose>. Acesso em: 5 ago. 2023.

FIOCRUZ. **As leishmanioses**. Disponível em: [http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/leishmaniose\\_cut\\_nea.htm](http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/leishmaniose_cut_nea.htm). Acesso em: 22 ago. 2023.

FIOCRUZ. **Leishmaniose ocular: novidades sobre doença silenciosa**. 2009. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose-ocular-novidades-sobre-doen%C3%A7a-silenciosa>. Acesso em: 26 set. 2023.

FLETCHER, Robert H.; FLETCHER, Suzanne W.; FLETCHER, Grant S. **Epidemiologia clínica: elementos essenciais**. 5. ed. Brasil: Artmed, 2014. 296 p.

FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar americana. In: MACHADO-PINTO, J. (Ed.). **Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1994. p. 319–328.

GALVIS-OVALLOS, Fredy; SILVA, Rafaella Albuquerque e; SILVA, Vanessa Gusmon da; SABIO, Priscila Basan; GALATI, Eunice Aparecida Bianchi. Leishmanioses no Brasil: aspectos epidemiológicos, desafios e perspectivas. **Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Protozoários**, Rio Branco, v. 9, n. 9, p. 227-255, 2020.

GODOY, Natalia Souza de; LIMA-JUNIOR, Manoel Sebastião da Costa; LINDOSO, José Angelo Lauletta; PEREIRA-CHIOCCOLA, Vera Lucia; OKAY, Thelma Suely; BRAZ, Lucia Maria Almeida. A PCR and RFLP-based molecular diagnostic algorithm for visceral leishmaniasis. **Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 62-70, ago. 2020. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/1995-7645.275414>.

GONTIJO, B. & De CARVALHO, L. B. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 71-80, jan./fev. 2003.

GONÇALVES, Luiz Fernando Camargo Teixeira. **Validação do diagnóstico molecular da leishmaniose visceral e da leishmaniose tegumentar na rotina diagnóstica de um laboratório de saúde pública, São Paulo, Brasil**. 2018. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Doenças Tropicais e Saúde Internacional, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 22 de outubro de 2023.

JARIYAPAN, Narissara; BATES, Michelle D.; BATES, Paul A.. Molecular identification of two newly identified human pathogens causing leishmaniasis using PCR-based methods on the 3' untranslated region of the heat shock protein 70 (type I) gene. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 1-16, 30 nov. 2021. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0009982>.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, [S.L.], v. 273, n. 5664, p. 595-600, jun. 1978. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/273595a0>.

LAINSON, R. Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.18, n. 1, p. 47-56, 1985.

Leishmaniasis: A review - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: [https://www.researchgate.net/figure/Diffuse-cutaneous-leishmaniasis-anergic-clinical-form\\_fig8\\_317263468](https://www.researchgate.net/figure/Diffuse-cutaneous-leishmaniasis-anergic-clinical-form_fig8_317263468) [accessed 29 Out, 2023].

LIMA, Jéssica Ribeiro de. **Estudo prospectivo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Manaus (AM): fatores imunológicos envolvidos no curso terapêutico com**

**antimonial pentavalente**. 2017. 148 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

LIMA, Karina Patricia Baracho de. **Detecção de *Leishmania (Viannia) braziliensis* através de PCR convencional e qPCR em amostras de saliva de pacientes de região endêmica do estado de Pernambuco**. 2019. 53 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

LANDIS, J. Richard; KOCH, Gary G.. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 159-174, mar. 1977. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/2529310>.

MACHADO, Priscilla Emmanuelle. **Comparação dos métodos parasitológico, imunológico e molecular na detecção de *Leishmania* spp. em amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar americana no estado de Santa Catarina**. 2004. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia- Área da Saúde, A Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MACHADO, Gustavo Uzêda; PRATES, Fernanda Ventin; MACHADO, Paulo Roberto Lima. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 94, n. 1, p. 9-16, fev. 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20198775>.

MATTOS, Marise da Silva. **Abordagem e Tratamento da leishmaniose tegumentar americana na Atenção Básica**. 2. ed. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2017. 92 p. Disponível em: [telessaude.sc.gov.br](http://telessaude.sc.gov.br).

MOUZZAKI, Tarik; MORALES-YUSTE, Manuel; MERINO-ESPINOSA, Gema; CHIHAB, Soumiya; FELLAH, Hassan; MARTIN-SANCHEZ, Joaquina; RIYAD, Myriam. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative *Leishmania* species in Morocco by using three PCR-based assays. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 7, n. 1, 4 set. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-420>.

MONTEIRO, Aurilene Gomes. **Diagnóstico molecular e identificação das espécies de *Leishmania* na leishmaniose visceral canina no Distrito Federal, Brasil**. 2014. 43 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MONROY-OSTRIA, Amalia; NASEREDDIN, Abedelmajeed; MONTEON, Victor M.; GUZMÁN-BRACHO, Carmen; JAFFE, Charles L. ITS1 PCR-RFLP Diagnosis and Characterization of Leishmanian Clinical Samples and Strains from Cases of Human Cutaneous Leishmaniasis in States of the Mexican Southeast. **Interdisciplinary Perspectives On Infectious Diseases**, [S.L.], v. 2014, p. 1-6, jul. 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/607287>.

MURBACK, Nathalia Dias Negrão; NASCIMENTO, Roberta Ayres Ferreira do; DORVAL, Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros; HANS FILHO, Günter; NAKAZATO, Katia Regina de Oliveira. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Mato Grosso do Sul, v. 86, p. 55-63, 2011.

NASCIMENTO, Veridiana Barreto do; OLIVEIRA, Jéssica Samara dos Santos; SANTOS, Luana Almeida dos; OLIVEIRA, Sheyla Mara Silva de; VASCONCELOS, Ed Carlos. Caracterização epidemiológica e sociodemográfica da leishmaniose tegumentar americana na região franco-brasileira. **Cadernos Unifoa**, [S.L.], v. 14, n. 41, p. 107-117, 3 dez. 2019. Fundação Oswaldo Aranha - FOA. <http://dx.doi.org/10.47385/cadunifoa.v14.n41.2977>.

OLIVEIRA, Edilson Aranda de. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana nos municípios limítrofes de Nova Lacerda e Conquista do Oeste, Mato Grosso. Connection Line - **Revista Eletrônica do Univag**, [S.L.], n. 5, p. 65-72, 14 abr. 2014. UNIVAG Centro Universitário. <http://dx.doi.org/10.18312/connectionline.v0i5.125>.

OLIVEIRA, Lorena de Albuquerque Pinheiro; ASSUNÇÃO, Anne Karine Martins; SIMOES NETO, Eudes Alves; SILVA, Mayara Cristina Pinto da. Avaliação da completude dos registros de leishmaniose tegumentar americana em área endêmica do Maranhão de 2017 a 2020. **SciELO**, [S.L.], 25 out. 2022. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/scielopreprints.4905>.

PAIVA-CAVALCANTI, Milena de; MORAIS, Rayana Carla Silva de; PESSOA-E-SILVA, Rômulo; TRAJANO-SILVA, Lays Adrienne Mendonça; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, Suênia da Cunha; TAVARES, Diego de Hollanda Cavalcanti; BRELAZ-DE-CASTRO, Maria Carolina Accioly; SILVA, Rafael de Freitas e; PEREIRA, Valéria Rêgo Alves. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 31-41, 17 jun. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2>.

PINHEIRO, A. B. S. **Uso simultâneo da intradermoreação de Montenegro e da reação em cadeia da polimerase em indivíduos suspeitos de leishmaniose tegumentar americana: uma estratégia acurada?**. Dissertação: Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Brasília, 2019.

REITHINGER, Richard; DUJARDIN, Jean-Claude; LOUZIR, Hechmi; PIRMEZ, Claude; ALEXANDER, Bruce; BROOKER, Simon. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 7, n. 9, p. 581-596, set. 2007. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(07\)70209-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(07)70209-8)

REGO, José Rogério Barbosa de Oliveira; MANSO, Orlando Gonçalves Ferreira Cavalcanti; D'ALMEIDA FILHO, Luciano Feitosa; POL-FACHIN, Laércio; LIMA, Ana Luísa Torres Fontes. Leishmaniose tegumentar americana: características epidemiológicas dos últimos 10 anos de notificação. *Brazilian Journal Of Implantology And Health Sciences*, [S.L.], v. 5, n. 3, p. 751-765, 23 jun. 2023. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**. <http://dx.doi.org/10.36557/2674-8169.2023v5n3p751-765>

RODRIGUES, Eduardo Henrique Gomes; BRITO, Maria Edileuza Felinto de; MENDONÇA, Mitzi Guedes; WERKHÄUSER, Roberto P.; COUTINHO, Eridan M.; SOUZA, Wayner V.; ALBUQUERQUE, Maria de Fátima P. Militão de; JARDIM, Márcio L.; ABATH, Frederico G. C.. Evaluation of PCR for Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of Endemicity in Northeastern Brazil. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 40, n. 10, p. 3572-3576, out. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.40.10.3572-3576.2002>.

SÁNCHEZ-GARCÍA, L.; WILKINS-RODRIGUEZ, A.; SALAIZA-SUAZO, N.; MORALES-MONTOR, J.; BECKER, I. Dihydrotestosterone enhances growth and infectivity of *Leishmania Mexicana*. **Parasite Immunology**, [S.L.], v. 40, n. 3, p. 1-8, 18 jan. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/pim.12512>.

SAKI, Najmaldin; PEZESHKI, Seyed Mohammad Sadegh. **Leishmania visualization on bone marrow aspiration sample 5**. 2018. Disponível em: <https://imagebank.hematology.org/collection/61426>. Acesso em: 22 set. 2023.

SCHÖNIAN, Gabriele; NASEREDDIN, Abedelmajeed; DINSE, Nicole; SCHWEYNOCH, Carola; SCHALLIG, Henk D.F.H; PRESBER, Wolfgang; JAFFE, Charles L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic**

**Microbiology And Infectious Disease**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 349-358, set. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0732-8893\(03\)00093-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0732-8893(03)00093-2).

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. R., & MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1989.

SANTOS, Vânia C.; ARAÚJO, Ricardo N.; MACHADO, Luciane A. D.; PEREIRA, Marcos H.; GONTIJO, Nelder F.. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. **Journal of Experimental Biology**, [S.L.], v. 211, n. 17, p. 2792-2798, 1 set. 2008. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.019836>

SCORZA, Breanna M.; CARVALHO, Edgar M.; WILSON, Mary E.. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 18, n. 6, 1296, 18 jun. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18061296>.

SILVA, Fernanda Cristina Assis. **Diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar americana em pacientes atendidos no Centro de referência em hanseníase e dermatologia sanitária da Universidade Federal de Uberlândia, CREDESH-UFU**. 2017. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

SIMON, Stephane; NACHER, Mathieu; CARME, Bernard; BASURKO, Celia; ROGER, Amaury; ADENIS, Antoine; GINOUVES, Marine; DEMAR, Magalie; COUPPIE, Pierre. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: revising epidemiology with pcr-rflp. **Tropical Medicine And Health**, [S.L.], v. 45, n. 1, 28 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s41182-017-0045-x>.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO – SINAN. Disponível em: <http://www.portalsinan.saude.gov.br/>. Acesso em: 18 de outubro de 2023.

STEVERDING, Dietmar. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 10, n. 1, 15 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>.

TORRES-GUERRERO, Edoardo; QUINTANILLA-CEDILLO, Marco Romano; RUIZ-ESMENJAUD, Julieta; ARENAS, Roberto. **Leishmaniasis: a review**. A review. 2017.

Disponível em: [https://www.researchgate.net/figure/Diffuse-cutaneous-leishmaniasis-anegetic-clinical-form\\_fig8\\_317263468](https://www.researchgate.net/figure/Diffuse-cutaneous-leishmaniasis-anegetic-clinical-form_fig8_317263468). Acesso em: 02 Out. 2023.

TSOKANA, Constantina N.; ATHANASIOU, Labrini V.; VALIAKOS, George; SPYROU, Vassiliki; MANOLAKOU, Katerina; BILLINIS, Charalambos. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis. **Leishmaniasis - Trends In Epidemiology, Diagnosis And Treatment**, [S.L.], 19 mar. 2014. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/57448>

## ANEXOS

### Anexo 1

**Universidade Federal do Maranhão**  
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**

---

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(maiores de 18 anos)

ESTUDO: *INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E ETNOFARMACOLÓGICA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE ATENDIDOS NA REGIONAL DE SAÚDE DE PINHEIRO-MA.*

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos (ou estaremos) fazendo. Leia atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo a você.

---

Eu, (inserir o nome, profissão) .....,  
 residente e domiciliado na .....,  
 , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo "*INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E ETNOFARMACOLÓGICA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE ATENDIDOS NA REGIONAL DE SAÚDE DE PINHEIRO-MA*". Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo é necessário para que se possa identificar quais as espécies de *Leishmania* sp. Que estão circulando no município de Pinheiro. E investigar, em ensaios pré-clínicos, o potencial anti-protozoário das espécies vegetais mais usadas no tratamento da Leishmaniose, conforme o levantamento Etnobotânico.
- II) Será feita uma coleta de material para demonstração direta do parasito e posterior análise para identificação da espécie de *Leishmania* presente na lesão.;
- III) Uma vez que envolve a coleta de material para demonstração direta do parasito por escarificação, a pesquisa apresenta, aos seus participantes, os riscos próprios deste procedimento. Nesse caso, algum desconforto, medo, dor, em alguns casos, sangramento. A coleta será realizada por profissionais de saúde capacitados (profissional cadastrado na Regional de Saúde), em ambiente adequado (sala de coleta, com aparatos de curativo e antissépticos), treinados para tomarem as providências necessárias para sanar qualquer um dos eventos citados.

- IV) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados no estudo;
- V) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- VI) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VIII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.
- Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- IX) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo para mim.
- Sim      ou       Não
- IX ) Poderei entrar em contato com a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – UFMA, no Fone (98) 3272-8708 (e-mail: *cepufma@ufma.br*) ou Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva nos telefones (98) 3272-8548 ou (98) 98803-0375 (e-mail: *mayara.silva@ufma.br*) para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.
- X) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XI) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE- apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XII) Resolução 466/12 – Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

São Luís,                      de                      de 20\_\_.

Paciente /  Responsável \_\_\_\_\_

**Responsável pelo Projeto:** \_\_\_\_\_

**DRA. MAYARA CRISTINA PINTO DA SILVA**  
**PROFESSOR ADJUNTO - UFMA**

## Anexo 2

República Federativa do Brasil  
Ministério da Saúde

**SINAN**  
SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO

FICHA DE INVESTIGAÇÃO **LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Nº

**CASO CONFIRMADO:**

**Leishmaniose cutânea:** todo indivíduo com presença de úlcera cutânea, com fundo granuloso e bordas infiltradas em moldura, com confirmação por diagnóstico laboratorial ou clínico epidemiológico.

**Leishmaniose mucosa:** todo indivíduo com presença de úlcera na mucosa nasal, com ou sem perfuração ou perda do septo nasal, podendo atingir lábios e boca (palato e nasofaringe), com confirmação por diagnóstico laboratorial ou clínico epidemiológico.

<b>Dados Gerais</b>	1 Tipo de Notificação 2 - Individual		2 Agravo/doença <b>LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA</b>		Código (CID10) B 5 5. 1		3 Data da Notificação	
	4 UF	5 Município de Notificação			Código (IBGE)			
	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)				Código		7 Data do Diagnóstico	
<b>Notificação Individual</b>	8 Nome do Paciente						9 Data de Nascimento	
	10 (ou) Idade 1 - Hora 2 - Dia 3 - Mês 4 - Ano		11 Sexo M - Masculino <input type="checkbox"/> F - Feminino 1 - Ignorado		12 Gestante 1-1º Trimestre 2-2º Trimestre 3-3º Trimestre 4- Idade gestacional Ignorada 5-Não 6- Não se aplica 9-Ignorado		13 Raça/Cor 1-Branca 2-Preta 3-Amarela 4-Parda 5-Indígena 9- Ignorado	
	14 Escolaridade 0-Analfabeto 1-1ª a 4ª série incompleta do EF (antigo primário ou 1º grau) 2-4ª série completa do EF (antigo primário ou 1º grau) 3-5ª a 8ª série incompleta do EF (antigo ginásio ou 1º grau) 4-Ensino fundamental completo (antigo ginásio ou 1º grau) 5-Ensino médio incompleto (antigo colegial ou 2º grau) 6-Ensino médio completo (antigo colegial ou 2º grau) 7-Educação superior incompleta 8-Educação superior completa 9-Ignorado 10- Não se aplica							
	15 Número do Cartão SUS				16 Nome da mãe			
<b>Dados de Residência</b>	17 UF		18 Município de Residência		Código (IBGE)		19 Distrito	
	20 Bairro		21 Logradouro (rua, avenida,...)				Código	
	22 Número		23 Complemento (apto., casa, ...)				24 Geo campo 1	
	25 Geo campo 2		26 Ponto de Referência				27 CEP	
	28 (DDD) Telefone		29 Zona 1 - Urbana 2 - Rural <input type="checkbox"/> 3 - Periurbana 9 - Ignorado		30 País (se residente fora do Brasil)			
	<b>Dados Complementares do Caso</b>							
<b>Antec. Epidem.</b>	31 Data da Investigação			32 Ocupação				
	33 Presença de Lesão 1 - Sim 2 - Não <input type="checkbox"/> Cutânea <input type="checkbox"/> Mucosa		34 Em Caso de Presença de Lesão Mucosa, Há Presença de Cicatrizes Cutâneas 1 - Sim 2 - Não <input type="checkbox"/>		35 Co-infecção HIV 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado			
<b>Dados Labor.</b>	36 Parasitológico Direto 1 - Positivo 2 - Negativo 3 - Não Realizado		37 IRM 1 - Positivo 2 - Negativo 3 - Não Realizado		38 Histopatologia 1 - Encontro do Parasita 2 - Compatível 3 - Não Compatível 4 - Não Realizado			
	39 Tipo de Entrada 1 - Caso Novo 2 - Recidiva 3-Transferência 9- Ignorado				40 Forma Clínica 1 - Cutânea 2 - Mucosa 9- Ignorado			
<b>Tratamento</b>	41 Data do Início do Tratamento		42 Droga Inicial Administrada 1 - Antimonial Pentavalente 2 - Anfotericina b 3 - Pentamidina 4 - Outras 5 - Não Utilizada					
	43 Peso Kg		44 Dose Prescrita em mg/kg/dia Sb <sup>+5</sup> 1 - Menor que 10 2 - Maior ou igual a 10 e menor que 15 3 - igual a 15 4 - Maior que 15 e menor que 20 5 - Maior ou igual a 20					
	45 Nº Total de Ampolas Prescritas Ampolas		46 Outra Droga Utilizada, na Falência do Tratamento Inicial 1 - Anfotericina b 2 - Pentamidina 3 - Outros 4 - Não Se Aplica					

