

CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA POR *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* NOS MUNICÍPIOS DE COSMÓPOLIS E INDAIATUBA - REGIÃO DE CAMPINAS, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

Selma Giorgio, Elisabeth R. Deberaldini, Raquel S. Pacheco, Marize Q. Pires, Eliana M. Zanotti-Magalhães, Nelson Cordeiro, Luis A. Magalhães, Maria Leticia Cintra, Nair S.N. Guimarães e Nivea M.G.M. Stedile

Com o objetivo de identificar a espécie de *Leishmania* envolvida nas afecções cutâneas de indivíduos residentes nos municípios de Cosmópolis e Indaiatuba, região de Campinas, Estado de São Paulo, correlacionamos dados clínicos, histopatológicos e testes de hibridização *in situ*. Os expressivos índices de incidência de leishmaniose tegumentar americana observados nesses municípios nos levaram a iniciar esses estudos. Nesse trabalho, apresentamos os dados relativos a seis indivíduos. As características das lesões, ulceradas, de difícil cicatrização e presentes em locais expostos do corpo sugeriram quadros de leishmaniose tegumentar americana. Os testes de intradermoreação de Montenegro, positivos em cinco dos seis pacientes analisados também reforçaram a suspeita de leishmaniose tegumentar americana. Os padrões histopatológicos, como reação exsudativa celular e granulomatosa e a dificuldade de isolamento dos parasitas obtidos de biópsias de lesões são compatíveis com aqueles descritos para *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Em testes de hibridização *in situ* do DNA do cinetoplasto de amastigotas das lesões dos seis pacientes, observamos que quatro deles apresentavam sinais de hibridização com a sonda de *L. (Viannia) braziliensis*, confirmando as suspeitas de que a *Leishmania* responsável pelas afecções cutâneas nos pacientes analisados era do subgênero *Viannia* e do complexo *braziliensis*.

Palavras-chaves: *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Leishmaniose humana*. *Leishmaniose tegumentar americana*.

As leishmanioses encontram-se, segundo a Organização Mundial da Saúde, entre as seis doenças infectoparasitárias de maior importância¹⁰. A leishmaniose tegumentar americana (LTA) ocorre em praticamente todas as regiões geográficas do Brasil¹¹, e no Estado de São Paulo tem merecido atenção nos últimos anos, tanto pela sua incidência como pela sua capacidade de dispersão^{2,15}.

Departamentos de Parasitologia do Instituto de Biologia e Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Direção Regional de Saúde XII, Campinas, SP; Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

Apoio Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Fundação de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da UNICAMP.

Endereço para correspondência: Profª Selma Giorgio, Depto. de Parasitologia/IB/UNICAMP, Caixa Postal 6109, 13083-970 Campinas, SP. Fax: (0192) 39-3124.

Recebido para publicação em 02/09/95.

Devido a importância epidemiológica que a doença adquiriu na região de Campinas (Estado de São Paulo), alguns autores realizaram, recentemente, investigações da fauna flebotomínea detectando *Lutzomyia migonei*, *L. intermedia* e *L. whitmani*. Os inquéritos epidemiológicos apontaram positividade de 34% no teste intradérmico de Montenegro na população da localidade rural de um município da região (Itupeva)¹². Baseados nas manifestações clínicas e na positividade ao teste de Montenegro dos pacientes, os autores sugeriram a *Leishmania (Viannia) braziliensis* como o agente etiológico¹². Entretanto, as características das lesões dos pacientes, os aspectos epidemiológicos da área de procedência dos mesmos e o comportamento do parasita *in vitro* são critérios insuficientes para a precisa identificação da espécie de *Leishmania*. A identificação precisa é importante, uma vez que as espécies do subgênero *Viannia* complexo *braziliensis*, associadas com afecções cutâneas, são

responsáveis também por lesões mucosas mutilantes⁹. O diagnóstico precoce e a caracterização do parasita serão úteis para o correto procedimento terapêutico e as ações futuras de saúde coletiva.

Este trabalho inicial, teve por objetivo correlacionar dados clínicos e histopatológicos com a caracterização por hibridização molecular *in situ* de amastigotas provenientes de lesões cutâneas de pacientes provenientes dos municípios de Cosmópolis e Indaiatuba, região de Campinas no Estado de São Paulo. A escolha dos municípios de Cosmópolis e Indaiatuba decorreu tanto da solicitação de auxílio do grupo de médicos da Direção Regional de Saúde da região de Campinas, como pelas indicações de uma situação epidêmica ocorrida no ano de 1994 (Tabela 1).

MATERIAL E MÉTODOS

Localização dos municípios. Cosmópolis está localizado a 22°38'35" sul de latitude e a 47°11'40" oeste de longitude. Sua área compreende 166km² e a população é de 40.073 habitantes. Indaiatuba está localizado a 23°05'12" sul de latitude e a 47°13'06" oeste de longitude. A área do município compreende 299km² e a população é de 116.018 habitantes. Ambos localizam-se na região de Campinas no Estado de São Paulo, Brasil.

Pacientes. Seis indivíduos de ambos os sexos, residentes nos municípios de Cosmópolis e Indaiatuba, foram objetos desse estudo. Todos os pacientes apresentavam lesões cutâneas sugestivas de LTA. Os dados, as características das lesões e os resultados dos testes realizados são mostrados nas Tabelas 2 e 3.

Reação Intradérmica de Montenegro. O antígeno de Montenegro, constituído de promastigotas de *Leishmania sp.* fluoretados e fenicados, foi fornecido pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, contendo 40mgN/ml. O antígeno foi inoculado intradermicamente na face anterior do antebraço direito na dose de 0,1ml. Após 72 horas foram feitas as leituras, identificando-se a área de endureção e medindo-se o diâmetro no sentido transverso, conforme o Manual do Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretária de Estado da Saúde de São Paulo. Foram considerados positivos os testes com área de endureção igual ou superior a 5mm⁸.

Histopatologia das lesões. Biópsias retiradas assepticamente das bordas das lesões cutâneas

foram fixadas em formol 10% e incluídas em parafina⁹. Os cortes foram corados pelo método de hematoxilina-eosina e examinados em microscópio óptico. Os fragmentos das lesões foram também examinados por aposição.

Cultivo de parasitas. Fragmentos de biópsias de lesões cutâneas foram retirados assepticamente e mantidos em meio de cultivo bifásico, que consiste de fase sólida NNN (agar com sangue desfibrinado de coelho) e fase líquida *brain heart infusion* 3,7% em solução de Hanks⁹. As culturas mantidas a 28°C em estufa incubadora, foram examinadas a partir do terceiro até o quadragésimo dia.

Hibridização molecular. Fragmentos de biópsia de lesões cutâneas retiradas assepticamente, foram pressionados diretamente em membrana de nylon (Nylon-1, cat.nº 11466-077, Gibco BRL). Amastigotas contidos nas membranas, após lise e desnaturação *in situ*, foram hibridizados contra sondas específicas de DNA do cinetoplasto (kDNA) e minicírculo clonado de *L. (V.) braziliensis* marcadas radiativamente com ³²P dATP pelo método de "random primer modificado", segundo protocolo descrito por Pacheco e cols¹⁰. Ambas, hibridizações e lavagens dos filtros, foram realizadas sob condições de alta stringência e os filtros expostos a -70°C por 24 horas com tela amplificadora de sinal. kDNAs purificados de cepas referência de *L. (V.) braziliensis* (M2903) e *L. (L.) amazonensis* (PH8) foram previamente adicionados às membranas e usados, respectivamente, como controles positivo e negativo.

RESULTADOS

Com base nos casos diagnosticados e notificados na região de Campinas, Estado de São Paulo, que abrange doze municípios, o número de afecções dermatológicas provocadas por *Leishmania* teve incremento de 2,1 vezes no ano de 1994 em relação ao ano precedente. Em relação aos municípios de Cosmópolis e Indaiatuba os coeficientes de incidência para o mesmo período aumentaram em aproximadamente cinco e oito vezes, respectivamente (Tabela 1). Esse quadro epidemiológico e a transmissão autóctone da doença (95%) sugeriram uma situação epidêmica no ano de 1994 nesses dois municípios.

Com o objetivo de identificar a espécie de *Leishmania* associada com as afecções cutâneas, analisamos alguns parâmetros parasitológicos

Giorgio S, Deberaldini ER, Pacheco RS, Pires MQ, Zanotti-Magalhães EM, Cordeiro N, Magalhães LA, Cintra ML, Guimarães NSN, Stedile NMGM. Casos de leishmaniose tegumentar americana por *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* nos municípios de Cosmópolis e Indaiatuba - região de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 29:419-424, set-out, 1996.

de quatro pacientes de Cosmópolis e de dois pacientes de Indaiatuba. A Tabela 2 mostra os dados dos pacientes e a descrição das lesões cutâneas. Os casos referem-se a adultos de ambos os sexos com idade variando de 21 a 55 anos. Clinicamente havia predomínio de lesão única e ulcerada em áreas descobertas do corpo (em cinco pacientes), apenas um paciente apresentou duas lesões, ambas com bordas ulceradas (Tabela 2). As áreas das lesões dos seis pacientes variavam de 2 a 3,5cm² e o tempo de persistência das lesões até a primeira visita ao Centro Médico variou de 30 a 60 dias.

Entre os exames realizados (Tabela 3), observamos que cinco dos seis pacientes responderam positivamente ao teste intradérmico de Montenegro. Apenas a paciente MMPMB apresentou resposta negativa ao antígeno de Montenegro (área de endurecimento de 4mm). Em relação aos exames histopatológicos realizados em biópsias das lesões cutâneas observamos que o padrão de reação exsudativa celular, caracterizado por um processo inflamatório crônico inespecífico, estava presente em lesões de quatro pacientes. O quadro de reação exsudativa e granulomatosa, uma inflamação crônica granulomatosa

Tabela 1 - Coeficiente de incidência de LTA dos municípios de Cosmópolis e Indaiatuba e da região de Campinas, SP nos anos de 1993 e 1994*.

Local	CI** de 1993	CI de 1994	Taxa de Variação do CI de 1994 em relação ao CI de 1993
Cosmópolis	7.70	37.4	4.90
Indaiatuba	3.60	27.6	7.70
Região de Campinas***	3.60	7.70	2.10

* Fonte: Grupo de Vigilância Epidemiológica-DIR XII-Campinas, SP.

** CI = Coeficiente de incidência; calculado com base na estimativa de população do SEADE para 1993 e 1994.

*** Região de Campinas abrange 12 municípios (antigo ERSA-27).

Tabela 2 - Dados e características das lesões de indivíduos com LTA residentes nos municípios de Indaiatuba e Cosmópolis, SP.

Paciente	Sexo	Idade	Características e localização das lesões cutâneas	Município
MECJ	F	21	ulcerada, fundo granuloso bordas elevadas (coxa)	Indaiatuba
TSF	F	55	bordas ulceradas (coxa e perna)	Cosmópolis
RSR	M	34	ulcerada, fundo granuloso bordas elevadas (face)	Cosmópolis
AT	M	41	ulcerada, fundo granuloso (coxa)	Cosmópolis
MMPMB	F	33	ulcerada, fundo granuloso (antebraço)	Indaiatuba
PM	M	43	ulcerada (perna)	Cosmópolis

M = masculino; F = feminino.

desorganizada sem necrose tecidual, estava presente em biópsia do paciente AT (Tabela 3). Em apenas um dos casos observamos formas amastigotas em lâminas de aposição (paciente MECJ). As tentativas de cultivo de promastigotas de *Leishmania*, provenientes das lesões, em meio bifásico foram negativas nos dois casos tentados (pacientes TSF e RSR). Vale salientar que as tentativas de cultivo dos parasitas de fragmentos de lesões cutâneas de outros pacientes não incluídos no grupo aqui descrito também foram na sua maioria negativas (8 de 10 pacientes) (dados não mostrados). Nos casos de cultivo positivo, os parasitas apresentavam aspecto característico de promastigotas, mas após alguns dias de cultura a motilidade e o crescimento cessavam.

As observações clínicas, a positividade nos testes de intradermoreação de Montenegro, as características histopatológicas e as observações das culturas das biópsias sugeriam quadros de LTA possivelmente provocados por *Leishmania* do subgênero *Viannia* complexo *braziliensis*. Os testes de hibridização *in situ* confirmaram nossas suspeitas. O teste foi positivo em biópsias de quatro dos seis pacientes analisados (AT, MMPMB, TSF e MECJ), indicando que o parasita responsável pelas lesões cutâneas pertence ao subgênero *Viannia* complexo *braziliensis* (Tabela 3 e Figura 1). As biópsias dos pacientes PM e RSR mostraram-se negativas mesmo após cinco dias de exposição. Sinais de hibridização foram obtidos com a sonda de *L. (V.) braziliensis* e a especificidade foi comprovada

pela total ausência de hibridização com o kDNA de *L. (L.) amazonensis*. O resultado de uma das auto-radiografias é mostrado na Figura 1.

Tabela 3 - Resultados dos testes parasitológicos realizados em indivíduos com LTA, residentes nos municípios de Indaiatuba e Cosmópolis, SP.

Paciente	RIM*	Padrões histopato**	Teste de hibridização <i>in situ</i> ***
MECJ	+	REC	+
TSF	+	REC	+
RSR	+	REC	-
AT	+	REG	+
MMPMB	-	REC	+
PM	+	NR	-

* RIM = Reação Intradérmica de Montenegro

** Padrões histopato = Padrões histopatológicos das lesões; REC = Reação exsudativa celular; REG = Reação exsudativa e granulomatosa; NR = não realizado.

expostos do corpo sugeriram quadros de LTA. Os testes de intradermoreação de Montenegro, positivos em cinco dos seis pacientes analisados, também reforçaram a suspeita de LTA (Tabela 3). Em relação as características histopatológicas observadas nas biópsias das lesões dos pacientes (Tabela 3), estas são compatíveis com aquelas definidas para lesões cutâneas provocadas por *L. (V.) braziliensis*^{5, 13}. Magalhães e cols⁵ descreveram padrões histopatológicos como: reação exsudativa celular, reação exsudativa e necrótica, reação exsudativa e necrótico-granulomatosa, reação exsudativa e granulomatosa e reação exsudativa e tuberculóide, e escassez ou ausência de parasitas. Entretanto, esses padrões são também observados em outros processos patológicos⁵, dificultando a obtenção de um diagnóstico definitivo.

Dentre os casos selecionados para este trabalho, apenas dois deles foram examinados quanto à presença de parasitas nas lesões e ambos forneceram resultados negativos. Tentativas com biópsias de lesões de outros oito indivíduos dos mesmos municípios e com lesões sugestivas de LTA também apresentaram resultados negativos (dados não mostrados). A dificuldade na obtenção e proliferação do parasita em meio de cultura é compatível com aquelas observadas para o isolamento de *Leishmania* do complexo *braziliensis*¹⁴. *L. (L.) amazonensis*, ao contrário, prolifera bem em condições semelhantes¹.

Os resultados dos parâmetros analisados (características das lesões, reação intradérmica de Montenegro, histopatologia e cultivo celular) sugeriram que a *Leishmania* responsável pelas afecções cutâneas dos pacientes analisados é do complexo *braziliensis*. Entretanto, apenas testes mais sensíveis, que analisem características bioquímicas e moleculares do parasita, como por exemplo, reações com anticorpos monoclonais, análises de isoenzimas e exames do kDNA são utilizados para identificar, inequivocamente, o subgênero e a espécie de *Leishmania*¹⁶. Em nossos testes de hibridização *in situ* do kDNA das lesões de seis pacientes (Tabela 3 e Figura 1), observamos que quatro deles apresentavam sinais de hibridização com a sonda de *L. (V.) braziliensis*. Duas das biópsias mostraram resultados negativos tanto para sondas de *L. (V.) braziliensis* como para *L.(L.) amazonensis*. Esses resultados negativos poderiam ser explicados pelo fato de que as lesões desses indivíduos eram de outra etiologia ou de que o número de amastigotas

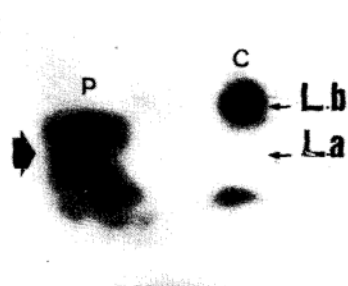


Figura 1 - Hibridização *in situ* de fragmentos de biópsia de lesão cutânea do paciente AT. A auto-radiografia mostra forte sinal (P) após a hibridização com a sonda radioativa de kDNA total de *L. (V.) braziliensis*. O controle (C) indica a positividade da reação com o kDNA homólogo purificado. A especificidade da sonda é comprovada pela ausência de hibridização cruzada com o kDNA de *L. (L.) amazonensis*.

DISCUSSÃO

Com o aumento de casos de LTA em municípios da região de Campinas, no Estado de São Paulo, e expressivos índices de incidência observados nos municípios de Cosmópolis e Indaiatuba (Tabela 1) decidimos iniciar análises de aspectos clínicos e parasitológicos das lesões de indivíduos residentes nessas cidades. O objetivo foi identificar o agente etiológico e neste trabalho analisamos os dados de seis pacientes. As características das lesões, ulceradas (Tabela 2), de difícil cicatrização e presentes em locais

nas lesões foi insuficiente para a detecção com as sondas. Esta última hipótese é apoiada pelo fato de que os dois pacientes com resultados negativos de hibridização *in situ* responderam positivamente ao teste intradérmico de Montenegro.

Em conclusão, os dados do presente trabalho apontam a presença de *L. (V.) braziliensis* em áreas da região de Campinas, SP, confirmando as suspeitas de Pignatti e cols¹². Estudos intensivos desta natureza juntamente com a elucidação de características epidemiológicas e dos mecanismos de transmissão (vetores e reservatórios) da LTA, serão necessários para estabelecimento de medidas efetivas de controle nas áreas atingidas.

SUMMARY

A study was carried out to identify Leishmania species involved in skin lesions of patients from Cosmópolis and Indaiatuba, State of São Paulo, Brazil. The epidemiological data of cutaneous leishmaniasis in two cities suggested a epidemic situation in 1994. The lesions were clinically characteristic of cutaneous leishmaniasis and five out six patients responded positively to Montenegro's intradermal test. The histopathology of skin lesions were characterized by two patterns: exsudative-cellular reaction and exsudative granulomatous reaction. The clinical and histopathological parameters suggested Leishmania (Viannia) braziliensis as the possible etiologic agent. In agreement, it was difficult to isolate and maintain the parasite in the laboratory. Characterization by in situ hybridization with kDNA amastigotes from lesions fragments confirmed that Leishmania (Viannia) braziliensis was the parasite responsible for the studied cutaneous lesions.

Key-words: Leishmania (Viannia) *braziliensis*. Cutaneous leishmaniasis. Human leishmaniasis. Diagnosis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chang K-P, Wallace RF. *Leishmania*. In: Jensen JB (ed) *In vitro* cultivation of Protozoan parasites. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 111-153, 1983.
2. Galimberti RTI, Katz G. Leishmaniose Tegumentar Americana. Divisão de doenças transmitidas por vetores/Zoonoses - Centro de Vigilância Epidemiológica - Boletim Epidemiológico 3-5, 1994.
3. Goto H, Sotto MN, Corbett CEP, Villaça-Neto CM, Laczynski CMM, Shaw JJ. A case of multiple

- lesion mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 93:48-51, 1990.
4. Grimaldi Jr G. Leishmanioses tegumentares: aspectos clínicos e imunopatológicos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 77:195-215, 1982.
5. Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 28: 253-262, 1986.
6. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomei, 1911). *Transactions of the Royal Tropical Medicine and Hygiene* 80:859-876, 1986.
7. Mascarini LM, Casanova C, Cipolli EAR, Mayo RC. Caracterização do perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) na Bacia do Rio Mogi Guaçu, Estado de São Paulo. *Revista de Patologia Tropical* 23 (supl.):336, 1994.
8. Melo MN, Mayrink W, Costa CA, Magalhães PA, Dias M, Williams P, Araújo FG, Coelho MV, Batista SM. Padronização do antígeno de Montenegro. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 19:161-164, 1977.
9. Organización Mundial de la Salud, Informe de um Comité de expertos de la OMS-Las leishmaniasis. *Série de Informes Técnicos* 701, 1984.
10. Pacheco RS, Brandão A, Sibajev A, Cupolillo E, Momem H, Degraive W. The genus *Critrithidia*: Genotypic diversity among species. *Journal of Protozoology Research* 4:71-82, 1994.
11. Pereira GFM, Fonseca HHR. Leishmaniose tegumentar americana: epidemiologia e controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 27 (supl. III):45-50, 1994.
12. Pignatti MG, Mayo RC, Alves MJCP, Souza SSAL, Macedo F, Pereira RM. Leishmaniose tegumentar americana na região nordeste do Estado de São Paulo - Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 28: 243-247, 1995.
13. Ridley DS. A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression. *Transactions of the Royal Tropical Medicine and Hygiene* 74:515-521, 1980.
14. Shaw JJ, Lainson R. The *in vitro* cultivation of members of the *Leishmania braziliensis* complex. *Transactions of the Royal Tropical Medicine and Hygiene* 75: 127, 1981.

Giorgio S, Deberaldini ER, Pacheco RS, Pires MQ, Zanotti-Magalhães EM, Cordeiro N, Magalhães LA, Cintra MI, Guimarães NSN, Stedile NMGM. Casos de leishmaniose tegumentar americana por *Leishmania (Viannia) braziliensis* nos municípios de Cosmópolis e Indaiatuba - região de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 29:419-424, set-out, 1996.

15. Wanderley DMV. Controle de flebotomíneos na vigilância epidemiológica da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo. *Revista de Patologia Tropical* 23 (supl.):157-160, 1994.

16. World Health Organization. Tropical Disease Research: Progress 1991-1992: Eleventh programme report of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Geneva, Switzerland, 1993.