

GAZETA MÉDICA DA BAHIA

A Gazeta Médica da Bahia (Gaz. méd. Bahia) [CDU: 616 051]), fundada em 1866, é um órgão oficial da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

Editor

José Tavares-Neto

Conselho Editorial

Aluizio Prata

Álvaro A. Cruz

Edgard M. de Carvalho Filho

Eliane Azevêdo

Heonir Rocha

Irismar Reis de Oliveira

Raymundo Paraná

Rodolfo Teixeira

Secretaria

Jundiára Paim

Diagramação

Luciana Bastianelli

Revisão

José Tavares-Neto

Correção e Impressão

Gráfica Contexto

Redação e Secretaria

Gazeta Médica da Bahia

Faculdade de Medicina da Bahia

Universidade Federal da Bahia

Largo do Terreiro de Jesus - Centro Histórico

40026-010 Salvador, Bahia, Brasil

Tel: (55) (71) 321-0983

Fax: (55) (71) 321-0383 - Ramal 203 ou 207

E-mail: gmbahia@ufba.br

<http://www.ufba.br/medicina/gmbahia>

Suporte Administrativo

Artigos submetidos para publicação, correspondência referente a separatas de artigos publicados, reclamações, mudança de endereços, “marketing”, propaganda e demais comunicados devem ser encaminhados à Redação da Gazeta Médica da Bahia, em atenção ao Editor, Prof. José Tavares-Neto.

Permissão

Copyright 2004 pertence à **Gazeta Médica da Bahia da Faculdade de Medicina da Bahia (FAMEB) da Universidade Federal da Bahia (UFBA)**. Todos os direitos reservados. Salvo sob autorização oficial da GMBahia ou da FAMEB, nenhuma parte ou seção da GMBahia poderá ser reproduzida em qualquer forma ou por quaisquer meios. A autorização para fotocópia ou reprodução de qualquer material veiculado pela GMBahia deverá ser feito pela mesma ou pela FAMEB através de carta oficial, na qual deverão conter, o volume, o número e as páginas a serem autorizadas.

Periodicidade: Semestral

Tiragem: 1.000 exemplares

Assinatura Gratuita: docentes e Bibliotecas de Escolas Médicas do Brasil

Indexação: LILACS, Bibliografia Brasileira de Medicina

APOIO

Grupo de Pesquisa em Hepatites e Fibrogênese Hepática (FAMEB/CPqGM-FIOCRUZ/BA)



CAPA

Foto da fachada da Faculdade de Medicina da Bahia, Largo do Terreiro de Jesus (Salvador, BA, Brasil), de R. A. Read (cerca de 1903/1904)

GAZETA MÉDICA DA BAHIA

Volume 75 • Número 1

ISSN 0016-545X

Janeiro/Junho 2005

SUMÁRIO/CONTENTS

Editorial	1
<i>Edgar M. Carvalho</i>	
 Artigos: Grupo de Pesquisa de Leishmanioses (FAMEB/CPqGM-FIOCRUZ/BA)	
Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil <i>Jackson M.L. Costa</i>	3
Influência da Saliva de Flebotomíneos na Leishmaniose Experimental e Humana <i>Clarissa Teixeira, Regis Gomes, Manoel Barral-Netto, Aldina Barral, Cláudia Brodskyn</i>	18
Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral <i>Olívia Bacellar, Edgar M. Carvalho</i>	24
O Modelo Experimental nas Infecções Causadas por <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i> <i>Camila I. de Oliveira, Manoel Barral-Netto</i>	35
Papel do Parasita e do Hospedeiro na Expressão Clínica das Leishmanioses <i>Ana Lúzia F. Schriefer, Rosana S. Sousa, Luiz Henrique Guimarães, Aristóteles Góes-Neto, Albert Schriefer</i>	46
Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar <i>Lucas P. Carvalho, Sara T. Passos, Amélia Ribeiro Jesus</i>	57
Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar <i>Luiz Henrique Guimarães, Paulo Roberto L. Machado, Hélio A. Lessa, Marcus Lessa, Argemiro D'Oliveira Jr, Edgar M. Carvalho</i>	66
Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e Perspectivas <i>Bruno B. Andrade, Viviane Boaventura, Manoel Barral-Netto, Aldina Barral</i>	75
Imunoterapia da Leishmaniose Tegumentar Americana <i>Roque P. Almeida, Jussamara S. Brito, Paulo R. Machado</i>	83
 Artigo de Revisão	
A Aplicação e o Conceito de Raça em Saúde Pública: Definições, Controvérsias e Sugestões para Uniformizar sua Utilização nas Pesquisas Biomédicas e na Prática Clínica <i>Crésio Alves, Cristina M. M. Fortuna, Maria Betânia P. Toralles</i>	92
Resenhas Bibliográficas	116
 Normas para Publicação	

ERRATA

Gaz. méd. Bahia, vol. 74, n. 2, p. 161-162

- Página 161, 2º parágrafo da 2ª coluna

Onde se lê

no estado em que se achão dentro d'uma esfera legitima exercem qualq.^r destas profissões, já profligando e punindo com as penas da lei os abusos, e infrene audacia dos charlatões. A tal respeito nossa legislação offerece consideravel lacuna, convindo collocar o exercicio da medicina e da Pharmacia sob outra egide, de sorte que revestida de garantias a profissão do Medico e Pharmaceutico conserve-se sempre na altura que lhe compete. =

Leia-se

... no estado em que se achão.

Em virtude do officio que V. S.^a dirigiu-me em 21 de Novembro de 1863 fiz publicar integralm.^{te} nas folhas diarias d'esta cidade os art.^{os} 29 e 35 do Regulamento de 29 de Setembro de 1851, concernentes á matricula dos individuos, que exercem a medicina em qualquer dos seus ramos, marcando o praso de 3 mezes, conforme o disposto no art. 28 do citado Regulam.^{to} para cumprimento d'esta formalidade. Alguns tem acudido á este convite, e devo ponderar á V. S.^a de que a execução d'esta medida encontra dificuldades insuperaveis, mormente em uma Provincia vasta como esta, em que não há Delegados de Saude em cada um dos Municipios, que inspeccionem tudo quanto é tendente ao exercicio da medicina, ou de qualq.^r dos seus ramos, = já amparando e protegendo aquelles que dentro d'uma esfera legitima exercem qualq.^r destas profissões, já profligando e punindo com as penas da lei os abusos, e infrene audacia dos charlatões. A tal respeito nossa legislação offerece consideravel, lacuna, convindo collocar o exercicio da medicina e da Pharmacia sób outra egide, de sorte que revestida de garantias a profissão do Medico e Pharmaceutico conserve-se sempre na altura que lhe compete. =

- Página 161, item III, 3º parágrafo da 2ª coluna

Onde se lê

Esta cidade continua em pessimas condições no que é tocante ao aceio de suas ruas, praças, caes, etc etc. A Camara Municipal, de quem sempre hei sollicitado providencias á Em virtude do officio que V. S.^a dirigiu-me em 21 de Novembro de 1863 fiz publicar integralm.^{te} nas folhas diarias d'esta cidade os art.^{os} 29 e 35 do Regulamento de 29 de Setembro de 1851, concernentes á matricula dos indivíduos, que exercem a medicina em qualquer dos seus ramos, marcando o praso de 3 mezes, conforme o disposto no art. 28 do citado Regulamt.^o para

cumprimento d'esta formalidade. Alguns tem acudido á este convite, e devo ponderar á V. S.^a de que a execução d'esta medida encontra dificuldades insuperáveis, mormente em uma Provincia vasta como esta, em que não há Delegados de Saude em cada um dos Municipios, que inspeccionem tudo quanto é tendente ao exercicio da medicina, ou de qualq.^r dos seus ramos, = já amparando e protegendo aquelles que respeito em consequencia de lhe faltarem sufficientes recursos, nada há podido realisar, sendo de esperar que a Administração da Prov.^a, authorisada, como se acha pela Assembléa Prov.^{al} alguma coisa faça n'este sentido.

Leia-se

Esta cidade continua em pessimas condições no que é tocante ao aceio de suas ruas, praças, caes, etc etc. A Camara Municipal, de quem sempre hei de sollicitado providencias á respeito em consequencia de lhe faltarem sufficientes recursos, nada há podido realisar, sendo de esperar que a Administração da Prov.^a, authorisada, como se acha pela Assembléa Prov.^{al} alguma coisa faça n'este sentido.

ANTONIO CARLOS NOGUEIRA BRITTO

Pesquisador e revisor da manuscrito original referente ao Relatório Acerca do Estado Sanitário da Província da Bahia durante o ano de 1864.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Reitor

Naomar Monteiro de Almeida Filho

FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA

Diretor

Vice-diretor

Substituto do Vice-Diretor

Representante no CONSEPE

Secretárias

Colegiado do Curso de Graduação em Medicina

Coordenador

Vice-Coordenador

Colegiado do Curso de Pós-graduação em Medicina e Saúde

Coordenador

Vice-Coordenador

Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia

(em convênio com o Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Bahia)

Coordenador

Vice-Coordenador

José Tavares-Neto

Modesto Jacobino

Fernando Carvalho

Thomaz Cruz

Sônia Celino e Denise Sapucaia

Mário Castro Carneiro

Sumaia Boaventura André

Álvaro A. Cruz

Luiz Carlos Santana Passos

Luiz Antônio Rodrigues Freitas

Washington L. Conrado dos Santos

DEPARTAMENTOS

Anatomia Patológica e Medicina Legal

Chefe

Vice-Chefe

Apoio Diagnóstico e Terapêutico

Chefe

Vice-Chefe

Cirurgia

Chefe

Vice-Chefe

Ginecologia, Obstetrícia e Reprodução Humana

Chefe

Vice-Chefe

Medicina

Chefe

Vice-Chefe

Medicina Preventiva

Chefe

Vice-Chefe

Neuropsiquiatria

Chefe

Vice-Chefe

Pediatria

Chefe

Vice-Chefe

Aldina M. Prado Barral

Marco Antonio C. de Almeida

Marcelo Benício dos Santos

Luiz Erlon Araújo Rodrigues

Jehorvan Lisboa Carvalho

Gildásio de Cerqueira Daltro

Hilton Pina

Jorge Luiz Sapucaia Calabrich

Albino Eduardo Machado Novaes

Edmundo Nassri Câmara

Ronaldo Ribeiro Jacobina

Vera Formigli

Antonio Reinaldo Rabelo

Irismar Reis de Oliveira

Cristiana Nascimento Carvalho

Maria Betania Pereira Torales

ADMINISTRAÇÃO DO PAVILHÃO DE AULAS DA FAMEB (*campus Canela*)

Sônia Felzemburg

DIRETÓRIO ACADÊMICO DE MEDICINA DA UFBA (DAMED)

Coordenador

José Santos de Santana

PROFESSORES TITULARES E EMÉRITOS DA FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA

TITULARES

Edgar Marcelino de Carvalho Filho
Fernando M. Carvalho
Irismar Reis de Oliveira
Lícia Maria Oliveira Moreira
Luciana Rodrigues Silva
Luiz Erlon Araújo Rodrigues
Luiz Guilherme da Costa Lyra
Marcelo Benício dos Santos
Manoel Barral-Netto
Oddone Braghiroli Neto
Reinaldo Pessoa Martinelli
Roberto Lorens Marback

EMÉRITOS^a

Zilton de Araújo Andrade
Aluizio Prata
Geraldo de Sá Milton da Silveira
Adilson Peixoto Sampaio
Rodolfo dos Santos Teixeira
Eliane Azevêdo
Nelson Barros
Heonir Rocha^b
Gilberto Rebouças^c

^a Na ordem de concessão do título pela Congregação.

^b Título aprovado pelo Conselho Superior da UFBA, mas ainda não outorgado.

^c Ainda não aprovado pelo Conselho Superior da UFBA.

DIRETORES DA FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA

1808 – 1828	COLEGIO MÉDICO-CIRÚRGICO DA BAHIA (sem nomeação de Diretores pelo Governo Imperial)
1829 – 1833	Jozé Avellino Barboza
1832	Lei de 03 de Outubro de 1832, da Regência Trina, em nome do Imperador D. Pedro II, altera a denominação para Faculdade de Medicina da Bahia
1833 – 1836	Jozé Lino Coutinho
1836 – 1844	Francisco de Paula Araujo e Almeida
1844 – 1855	João Francisco de Almeida
1855 – 1857	Jonathas Abbott*
1857 – 1871	João Baptista dos Anjos
1871 – 1874	Vicente Ferreira de Magalhães*
1874 – 1881	Antonio Januario e Faria
1881 – 1886	Francisco Rodrigues da Silva
1886 – 1891	Ramiro Affonso Monteiro
1891 – 1895	Antonio Cerqueira Pinto
1895 – 1898	Antonio Pacifico Pereira
1898 – 1901	José Olimpio de Azevedo
1901 – 1908	Alfredo Thomé de Britto
1908 – 1912	Augusto Cezar Vianna
1913 – 1914	Deocleciano Ramos
1915 – 1930	Augusto Cezar Vianna
1931 – 1932	Aristidis Novis

1932 – 1933	Augusto Cezar Vianna
1933 – 1936	José de Aguiar Costa Pinto
1936 – 1946	Edgard Rego Santos
1946 – 1950	José Olympio da Silva*
1950	Francisco Peixoto de Magalhães Neto*
1950 – 1953	Eduardo Lins Ferreira Araujo*
1953 – 1955	Hosannah de Oliveira*
1955 – 1960	Rodrigo Bulcão D'Argollo Ferrão
1960 – 1962	Benjamim da Rocha Salles
1962 – 1965	Carlos Geraldo de Oliveira
1965 – 1968	Jorge Augusto Novis
1968 – 1972	Rodrigo Bulcão D'Argolo Ferrão
1973 – 1977	Renato Tourinho Dantas
1977 – 1980	Plínio Garcez de Senna
1980 – 1984	Newton Alves Guimarães
1984 – 1988	José Maria de Magalhães Netto
1988 – 1992	Heonir de Jesus Pereira Rocha
1992 – 1996	Thomaz Rodrigues Porto da Cruz
1996 – 2000	José Antonio de Almeida Souza
2000	Fernando M. Carvalho*
2000 – 2003	Manoel Barral-Netto
2003	Orlando Figueira Sales*
2003 –	José Tavares-Neto

(*) Diretor Interino

CORPO DOCENTE DA FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA, SEGUNDO A UNIDADE DEPARTAMENTAL

DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA E MEDICINALEGAL

- Aldina Maria Prado Barral
- Amélia Maria Ribeiro de Jesus
- Antonio Nery Alves Filho
- Aristides Chetto de Queiroz
- Daysi Maria de Alcantara Jones
- Eduardo Antonio Gonçalves Ramos
- Eduardo José Bittencourt Studart
- Helenemarie Schaer Barbosa
- Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo
- José Américo Seixas Silva
- Luciano Espinheira Fonseca Junior
- Luis Carlos Cavalcante Galvão
- Luiz Antonio Rodrigues de Freitas
- Manoel Barral-Netto
- Marco Antonio Cardoso de Almeida
- Mitermayer Galvão dos Reis
- Moysés Sadigursky
- Paulo Roberto Fontes Athanazio
- Raul Coelho Barreto Filho
- Renée Amorim dos Santos
- Ruy Adroaldo Mendes Moreira

DEPARTAMENTO DE APOIO DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICO

- Cesar Augusto de Araújo Neto
- Hélio Braga
- Luiz Erlon Araújo Rodrigues
- Marcelo Benício dos Santos
- Rosa Vianna Dias da Silva Brim

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

- Agnaldo da Silva Fonseca
- Alfredo Rogério Carneiro Lopes
- André Barbosa Castelo Branco
- André Ney Menezes Freire
- Antonio Argolo Sampaio Filho
- Antonio Francisco Junquilha Vinhaes
- Antonio Gilson Lapa Godinho
- Antonio Marcos Ferracini
- Antonio Natalino Manta Dantas
- Carlos Alberto Paes Alves
- Cicero Fidelis Lopes
- Clotario Neptali Carrasco Cueva
- Danilo Cruz Sento Sé
- Durval Campos Kraychete

- Ediriomar Peixoto Matos
- Edson Bastos Freitas
- Edvaldo Fahel
- Epaminondas Castelo Branco Neto
- Gervasio Batista Campos
- Gildasio de Cerqueira Daltro
- Heitor Carvalho Guimarães
- Helio Andrade Lessa
- Jayme Victal dos Santos Souza
- Jehorvan Lisboa Carvalho
- Jorge Luiz Andrade Bastos
- José Luiz Coelho
- José Neiva Eulálio
- José Siqueira de Araújo Filho
- José Valber Lima Menezes
- Juarez Araujo Andrade
- Juvenal Mascarenhas Nassari
- Leandro Publio da Silva Leite
- Leopoldo Alves Ribeiro
- Luciano Santos Garrido
- Luiz Schiper
- Maria de Lourdes Lima Falcão
- Mário Castro Carreiro
- Mário Cesar Santos de Abreu
- Milton da Silva Barros
- Modesto Antonio de Oliveira Jacobino
- Nilo Cesar Leão Barreto de Souza
- Nilson Ferreira Gomes
- Normand Araujo Moura
- Oddone Braghirolli Neto
- Osório Jose de Oliveira Filho
- Otto Roberto Mendonça de Alencar
- Paulo Afonso Batista dos Santos
- Paulo André Jesuíno dos Santos
- Pedro Hamilton Guimarães Macedo
- René Mariano de Almeida
- Roberto Lorens Marback
- Venceslau dos Reis Souza Silva
- Vilson Ulian
- Virginia Emilia Café Cardoso Pinto
- Vitor Lucio Oliveira Alves
- Wellington Alves Cavalcante

DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA, OBSTETRÍCIA e REPRODUÇÃO HUMANA

- Antonio Carlos Vieira Lopes
- Carlos Augusto Santos de Menezes

- Conceição Maria Passos de Queiroz
- Denise dos Santos Barata
- Edson O'Dwyers Júnior
- Fortunato Trindade
- Hilton Pina
- Hugo da Silva Maia Filho
- Ione Cristina Barbosa
- Jorge Luiz Sapucaia Calabrich
- Maria da Purificação Paim Oliveira Burgos
- Maria Teresa Rebouças Gonçalves de Azevedo
- Nélia Maria Dourado Lima Barreto
- Nilma Antas Neves
- Olivia Lucia Nunes Costa
- Vera Lucia Rodrigues Lobo

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

- Albino Eduardo Machado Novaes
- Alcina Maria Vinhaes Bittencourt
- Alvaro Augusto Souza da Cruz Filho
- André Castro Lyra
- André Luiz Peixinho
- André Vila Serra
- Antonio Alberto da Silva Lopes
- Antonio Carlos Moreira Lemos
- Antonio Raimundo Pinto de Almeida
- Argemiro D'Oliveira Junior
- Carlos Roberto Brites Alves
- Edgar Marcelino de Carvalho Filho
- Edilton Costa e Silva
- Edmundo José Nassari Câmara
- Eleonora Lima Peixinho
- Elvira Barbosa Quadros Cortes
- Ênio Ribeiro Maynard Barreto
- Fernando Antonio Glasner da Rocha Araújo
- Francisco Hora de Oliveira Fontes
- George Barreto de Oliveira
- Gilvandro de Almeida Rosa
- Helito Mascarenhas Bittencourt
- Helma Pinchemel Cotrim
- Igelmar Barreto Paes
- Iraci Lucia Costa Oliveira
- Jackson Noya Costa Lima
- Jacy Amaral Freire de Andrade
- Jorge Carvalho Guedes
- Jorge Luiz Pereira e Silva
- Jose Alberto Martins da Matta
- José Antonio de Almeida Souza
- José Tavares Carneiro Neto
- Leila Maria Batista Araújo
- Luis Guilherme Costa Lyra
- Luiz Carlos Santana Passos
- Margarida Célia Lima Costa Neves
- Margarida Maria Dantas Dutra

- Maria da Glória Mota Bonfim
- Maria das Dores Acioli de Lima
- Maria Ermecília Almeida Melo
- Maria Georgina Barbosa
- Maria Margarida dos Santos Britto
- Maria Zenaide Gonzaga
- Murilo Pedreira Neves Júnior
- Neide Ferraz de Castro Dias
- Newton Sales Guimarães
- Octavio Henrique Messeder
- Raimundo Paraná Ferreira Filho
- Reinaldo Pessoa Martinelli
- Roberto José da Silva Badaró
- Romario Teixeira Braga Filho
- Roque Aras Júnior
- Roque Pacheco de Almeida
- Tania Moraes Regis
- Tarcisio Matos de Andrade
- Thomaz Rodrigues Porto da Cruz
- Vitória Regina Pedreira de Almeida

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA

- Annibal Muniz Silvany Neto
- Eduardo Jose Farias Borges dos Reis
- Fernando Martins Carvalho
- Lorene Louise Silva Pinto
- Marco Antônio Vasconcelos Rego
- Mônica Angelim Gomes de Lima
- Paulo Gilvane Lopes Pena
- Rita de Cássia Franco Rego
- Ronaldo Ribeiro Jacobina
- Sumaia Boaventura André
- Vera Lucia Almeida Formigli

DEPARTAMENTO DE NEUROPSIQUIATRIA

- Ailton de Souza Melo
- Ângela Marisa de Aquino Miranda Scippa
- Antonio Fernando Bermudez Dreyer
- Antonio Reinaldo Rabelo
- Antonio de Souza Andrade Filho
- Arlucia de Andrade Fauth
- Carlos Antonio Ferreira Teixeira
- Célia Nunes Silva
- Domingos Macedo Coutinho
- Irismar Reis de Oliveira
- José Cortes Rolemberg Filho
- José Marcos Pondé Fraga Lima
- Mario Ernani Ancilon Cavalcanti
- Miriam Elza Gorender Magalhães
- Rita de Cássia Saldanha de Lucena
- Roberto Miguel Correia da Silva
- Rosa Garcia Lima
- Vitoria Eugênia Ottoni de Carvalho

- Waldeck Barreto D’Almeida
- Wania Marcia Aguiar
- William Azevedo Dunninghan

DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA

- Angela Peixoto de Mattos
- Angelina Xavier Acosta
- Cresio de Aragao Dantas Alves
- Cristiana Maria Costa Nascimento de Carvalho
- Déa Mascarenhas Cardoso
- Dulce Emilia Moreira C. Garcia
- Edilson Bittencourt Martins
- Edna Lucia Santos de Souza
- Hagamenon Rodrigues da Silva
- Hugo da Costa Ribeiro Junior
- Isabel Carmen Fontes da Fonseca
- Licia Maria Oliveira Moreira
- Luciana Rodrigues Silva
- Luís Fernando Fernandes Adan
- Luiza Amelia Cabus Moreira
- Maria Betânia Pereira
- Maria do Socorro Heitz Fontoura
- Nadya Maria Bustani Carneiro
- Silvana Fahel da Fonseca
- Solange Tavares Rubim de Pinho
- Suzy Santana Cavalcante
- Vanda Maria Mota de Miranda

EDITORIAL

Pioneira entre as escolas médicas do Brasil, a Faculdade de Medicina da Bahia tem uma longa tradição em contribuições científicas com ênfase em doenças infecciosas tropicais. Nos últimos 25 anos, principalmente devido à formação de um grupo de pesquisadores com interesse voltado para o estudo de aspectos básicos e clínicos relacionados à infecção por leishmania, o impacto das contribuições científicas nesta área, oriundas de pesquisadores baianos, ultrapassou as fronteiras do país, fazendo com que centros de pesquisa da Bahia fossem reconhecidos internacionalmente como núcleos de excelência.

Embora as instituições sejam permanentes e ofereçam a base para o desenvolvimento de projetos, são as pessoas as principais responsáveis pelas grandes mudanças que ocorrem na área de saúde. Dessa forma, é importante que sejam aqui lembrados pesquisadores que, de formas variadas, contribuíram para o grande desenvolvimento do estudo das leishmanioses nestas duas últimas décadas na Bahia. Os professores Heonir Rocha, Rodolfo Teixeira, Warren Johnson e Thomas Jones, através da implementação de um projeto de colaboração internacional, permitiram o estabelecimento de novos laboratórios no Complexo Hospital Universitário Prof. Edgard Santos e na Fundação Gonçalo Moniz (FIOCRUZ/BA) e a estrutura para os trabalhos de campo na área endêmica de Jacobina. Teve também participação destacada, na fase inicial desses estudos, o Prof. Philip Marsden que, após passagem na Bahia na década de 60, radicou-se em Brasília/DF e, juntamente com Vanize Macedo e Aluizio Prata, criaram as condições para serem iniciados os estudos nas regiões de Três Braços e Corte de Pedra, cidades do estado da Bahia.

De 1980 até o presente, 308 manuscritos sobre a leishmania e as leishmanioses, realizados nesses laboratórios e nas áreas endêmicas supra mencionadas, foram publicados por pesquisadores baianos em revistas de grande impacto, como o Journal of Clinical Investigation, Journal of Immunology, American Journal of Pathology, Lancet, European Journal of Immunology, Journal of Infectious Diseases, Infection and Immunity, Proceedings of the National Academy of science, New England Medical Journal and Science. Esses trabalhos tiveram uma grande importância para o entendimento das leishmanioses, com contribuições sobre a epidemiologia, imunologia, patogênese, manifestações clínicas e tratamento, como:

- 1) identificação que a inabilidade de produzir interferon gama (IFN- γ) e conseqüente falta de ativação macrófágica é o principal defeito observado na leishmaniose visceral e na leishmaniose cutânea difusa;
- 2) documentação de que a interleucina 10 (IL-10) é a principal citocina envolvida na supressão da resposta imune nessas doenças;
- 3) demonstração de que a restauração da resposta imune *in vitro* na leishmaniose visceral pode ser feita com a neutralização da IL-10 e com adição de IL-12;

- 4) evidência de que a maioria dos indivíduos infectados por *L. chagasi* desenvolvem uma forma assintomática ou subclínica da infecção;
- 5) demonstração do papel da saliva do flebotomíneo na proteção e na progressão da infecção causada por leishmania;
- 6) importância do TGF- β na patogênese da infecção experimental causada por *L. braziliensis*;
- 7) associação entre diferenças genotípicas e fenotípicas de isolados da mesma espécie de leishmania com diferentes formas clínicas da doença;
- 8) descrição da história natural da infecção causada por *L. braziliensis*;
- 9) caracterização clínica e imunológica da leishmaniose disseminada como forma emergente da infecção por *L. braziliensis*;
- 10) identificação do papel da resposta imune na patologia associada à leishmaniose cutânea e mucosa;
- 11) descoberta de novas formas de tratamento para a leishmaniose tegumentar e visceral com base na imunoterapia.

Neste número da Gazeta Médica da Bahia, são apresentadas nove revisões sobre diferentes aspectos das leishmanioses, com ênfase nas contribuições trazidas pelos estudos realizados por pesquisadores baianos. Estas informações são um testemunho de que, quando as condições básicas são fornecidas, pesquisas de ponta podem ser realizadas em nosso meio, e que a criação dessas condições é um caminho importante para a solução dos problemas regionais de saúde.

Edgar M. Carvalho

Professor titular de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Bahia (UFBA)
Membro do Conselho Editorial da Gazeta Médica da Bahia

Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil

Epidemiology of the Leishmaniasis in Brazil

Jackson M. L. Costa

Pesquisador associado do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ-BA, Brasil

A ocorrência de várias espécies de *Leishmania*, o contínuo aumento das afecções causadas por esses parasitas (formas tegumentares e visceral) e as diferentes situações epidemiológicas encontradas, tanto em regiões de colonização recente quanto antiga, com tendência à urbanização, vem requerendo a adoção de diferentes estratégias para o controle dessas endemias no Brasil. Baseado em dados de notificação do setor de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS), avaliou-se a situação da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral Americana (LVA) por municípios e as perspectivas de seu controle. Em relação à LTA, observou-se um coeficiente de detecção (CD) variável entre 10,45 e 22,9 por 100.000 habitantes; mostrando uma expansão geográfica do referido agravo. A região Norte destacou-se com 34,9% do total de casos, com risco da população adoecer de 92,3/100.000 habitantes (cinco vezes a média nacional). A expansão do Centro-Oeste correspondeu à segunda maior em CD, com uma média de 38,8/100.000 habitantes; sendo seguida pela região Nordeste, com 30,8/100.000 habitantes, para o ano de 1995, contribuindo com o 2º maior número de casos do país (28%), porém com risco da população adoecer de 19,7/100.000 habitantes. As demais regiões (Sudeste e Sul) não desempenharam papel preocupante quando se tratou da distribuição dos casos em nosso país. No que diz respeito à LVA, observou-se que, nos últimos dez anos, a média anual de casos foi de 3.156 casos, e a incidência de dois casos/100.000 habitantes. A faixa etária mais predisposta a desenvolver a doença são os menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de 5 anos. O sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado. Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelaram a peri-urbanização e urbanização da LVA em nosso país. As perspectivas de controle da doença são complexas, requerendo esforços junto às comunidades, envolvendo educação, provisão de informações, promoção de saúde, devendo ser específicas, conforme a situação epidemiológica de cada região. O conhecimento do maior número de casos suspeitos, diagnóstico e tratamento precoces, identificação do agente etiológico, conhecimento das áreas de transmissão e redução do contato homem vetor por meio de medidas específicas devem ser destacados.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar americana, leishmaniose visceral americana, Ministério da Saúde, controle, Brasil.

The existence of a number of different species of Leishmania, the persistent increase in the infection rate of diseases caused by this parasite (both tegumentary and visceral forms of the disease), the different epidemiological status of regions where settlement has been long established or is more recent, and the trend towards urbanization have led to the adoption of different strategies for the control of leishmaniasis in Brazil. The current status of American tegumentary leishmaniasis (ATL) and American visceral leishmaniasis (AVL) was evaluated in the municipalities based on the records of the Health and Sanitation Department of the Ministry of Health, and the perspectives for controlling these diseases were assessed. With respect to ATL, the incidence coefficient (IC) ranged from 10.45

Recebido em 22/02/2005

Aceito em 27/05/2005

Endereço para correspondência: Dr. Jackson M.L. Costa. Laboratório de Imunoparasitologia - LIP. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal 40.296-710 - Salvador-Bahia-Brasil. E-mail: jcosta@cpqgm.fiocruz.br. Fone: 71 – 3356 8782 ramais 259 / 279. Fax: 71 3356 8782 ramal 261.

to 22.9 per 100,000 inhabitants, clearly demonstrating a geographical expansion of the disease. The northern region has 34.9% of the total cases in the country and a population hazard of acquiring the disease of 92.3/100,000 inhabitants, five times the national average. The central-west of the country is the region with the second highest IC, with a mean of 38.8/100,000 inhabitants (followed by the northeast with 30.8/100,000 inhabitants in 1995) contributing with the second largest number of cases in the country (28%), and a risk of acquiring the disease of 19.7/100,000 inhabitants. In the other regions (the south and south-east of the country) there was a low incidence of the disease. With respect to AVL, an average of 3,156 cases per year has been observed over the past ten years, an incidence of two cases/100,000 inhabitants. Children up to ten years of age are most affected by the disease (54.4%), while 41% of reported cases are in children under 5 years of age. The incidence of the disease is higher in males. Epidemiological data for the past ten years show the peri-urbanization and urbanization of AVL in this country. The perspectives for controlling the spread of the disease are complex, comprising efforts within communities, education, provision of information and promotion of health. Efforts should be specific, depending on the epidemiological status of each region. Data on the number of suspected cases, diagnosis and early treatment, identification of the causative agent, identification of the areas of transmission and efforts aimed at reducing the contacts between man and vector are specific preventive measures that should be implemented.

Key words: American tegumentary leishmaniasis, American visceral leishmaniasis, Ministry of Health, control, Brazil.

As leishmanioses constituem um crescente problema de saúde pública, não somente no Brasil, onde é considerada uma das endemias de interesse prioritário, como em grande parte dos continentes americano, asiático, europeu e africano. Sua importância levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a incluí-la entre as seis doenças consideradas prioritárias no programa de controle da referida instituição⁽⁴⁰⁾.

A caracterização das leishmanioses como um grupo de doenças em que o meio ambiente exerce um papel importante em seu aparecimento deveu-se à escola criada por Pavlovski, que as usou como modelo para seus estudos sobre ecologia das doenças. Esta escola, fugindo da teoria unicista de causalidade das doenças, enfatizou o fator ambiente dentro da tríade epidemiológica (agente-meio ambiente-hospedeiro). Assim, foram descritas como passíveis de ocorrerem em circuitos limitados por fatores ambientais como micro-clima, relevo geográfico, espécies de animais reservatórios e fauna flebotomínica. Posteriormente, foi situada num contexto mais amplo, em que o conceito de multicausalidade das doenças foi explicado, como a “teia” de causalidade da leishmaniose cutânea na Etiópia descrita por Bray⁽⁸⁾, na qual enfatiza as formas de interação do homem com o meio ambiente como elemento importante na aquisição da infecção^(8,12).

Assim, em todos os continentes, foram encontradas transmissões dos parasitas em ciclos silvestres entre animais, em ambientes quentes e úmidos das florestas tropicais e subtropicais e até nas estepes e florestas temperadas do Mediterrâneo e da Rússia. O contato do homem com esses ambientes proporcionaram a ocorrência da doença sob a forma de zoonose, às vezes dividindo com os animais o papel de reservatório^(20,25,26).

Em algumas situações, o desequilíbrio ambiental criado pela invasão do homem às florestas forçou uma adaptação dos vetores e reservatórios silvestres da doença a um ambiente peri-domiciliar ou mesmo domiciliar. Em uma forma mais evoluída, o homem pode tornar-se o seu reservatório e a doença se constituirá em uma antroponose, como ocorre no calazar indiano ou na leishmaniose cutânea urbana do Oriente Médio^(16,40).

Contudo, tal evolução não se deu de forma similar entre as parasitoses, daí ser os seus padrões epidemiológicos extremamente diversos a depender da região geográfica e de fatores sócio-culturais da população envolvida. Esta diversidade impossibilita o estabelecimento de padrões epidemiológicos e ecológicos comuns para as diversas regiões, dificultando, assim, a adoção de medidas de controle da doença^(1,2,12,17).

Leishmaniose Tegumentar Americana

A importância das leishmanioses (tegumentar e visceral) entre os problemas de saúde pública em geral nos países endêmicos, incluindo o Brasil, é difícil de ser avaliada, em função da deficiência de registros oficiais da maioria dos casos. Lainson (1981)⁽²⁶⁾ demonstrou a dificuldade que os consultores tiveram de incluí-la entre as seis doenças mais importantes do mundo pela OMS, em função da fragilidade dos dados e conhecimentos disponíveis sobre a doença nos países em que a mesma ocorre^(25,26). De acordo com a informação estatística mundial, foi calculado um índice global de infecção de mais de 400.000 casos por ano, havendo indicações do aumento a cada ano^(16,25,26,40).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) distribui-se amplamente no continente americano, desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina. Mesmo sendo uma doença endêmica em várias regiões desse continente, sua real prevalência não se encontra estabelecida, em virtude de alguns fatores, como: sub-registros de dados; inúmeros diagnósticos diferenciais existentes; infecções inaparentes; variações de resposta do hospedeiro e de agentes etiológicos envolvidos^(6,20-22). Nas Américas, são reconhecidas atualmente onze espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana, como mostra o Quadro 1.

Não é fácil avaliar a importância desta doença no Brasil. Pelos dados de notificação disponíveis, observa-se que a mesma encontra-se em franco processo de crescimento, tanto em magnitude como em expansão geográfica (Gráfico 1). Nas últimas décadas, a análise de estudos epidemiológicos da LTA tem sugerido mudanças em seu comportamento. Inicialmente considerada como zoonose de animais silvestres que acometia ocasionalmente pessoas em contato com florestas, a mesma começou a ocorrer em zonas rurais já praticamente desmatadas e também em regiões peri-urbanas^(2,5,6,12). Neste amplo contexto de diferentes regiões geográficas, a doença no Brasil pode apresentar-se com três perfis epidemiológicos^(5,6).

Leishmaniose Tegumentar Puramente Silvestre

Ocorre através de surtos epidêmicos associados à derrubada das matas (construção de estradas, instalação de povoados em regiões pioneiras) e da exploração desordenada das florestas (extração de madeira, agricultura, mineração). Neste caso, a LTA é, fundamentalmente, uma zoonose de animais silvestres que pode atingir o homem quando este entra em contato com os focos zoonóticos. Um exemplo típico desta forma é a que acontece na Amazônia, Norte do Brasil^(1,36).

Leishmaniose Tegumentar Silvestre Modificada

Ocorre através de surtos epidêmicos sazonais, em áreas com pequenos focos residuais de mata primária. A infecção acontece na interface da área peri-domiciliar e das áreas de mata, onde o homem costuma desenvolver atividades ligadas à agricultura. A infecção apresenta ciclos sazonais quando a densidade populacional do flebotomíneo vetor está elevada. Um exemplo dessa forma de transmissão acontece no vale do São Francisco, município de Caratinga, Minas Gerais; no município de Viana, Espírito Santo, e na região de Corte de Pedra, região cacaueira da Bahia^(5,6,12,35).

Leishmaniose Tegumentar Peri-Urbana

Ocorre de forma endemo-epidêmica, em áreas de colonização antiga, onde existe a suspeita da participação de animais domésticos (cão doméstico e equinos, principalmente) como reservatórios da infecção para o flebotomíneo vetor do parasita. Como exemplo: ocorrência de casos por *L. V. braziliensis* em áreas peri-urbanas da cidade do Rio de Janeiro, na região Sudeste do país⁽²⁴⁾.

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, no período de 1970 a 2001, o número de casos de LTA variou de 3.000 a 37.000. A partir da década de 90, os casos apresentaram pequeno aumento com grande variação anual. De 1985 a 1999, a LTA em humanos apresentou coeficiente de detecção (CD) que oscilou

Quadro 1. Principais espécies de *Leishmania* dermatrópicas causadores de doença em humanos nas Américas.

Subgênero <i>Viannia</i> (Lainson & Shaw, 1972)	Acometimento clínico no homem	Distribuição geográfica
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> (Vianna, 1911)	Lesões cutâneas e mucosas	Da América Central ao norte da Argentina
<i>Leishmania (V.) peruviana</i> (Velez, 1913)	Predominantemente lesões cutâneas	Vales elevados interandinos e encosta oeste dos Andes
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i> (Floch, 1954)	Predominantemente lesões cutâneas	Calha norte da Bacia Amazônica, Guianas e países do noroeste sulamericano
<i>Leishmania (V.) panamensis</i> (Lainson & Shaw, 1972)	Predominantemente lesões cutâneas	América Central e costa pacífica da América do Sul
<i>Leishmania (V.) lainsoni</i> (Silveira et al, 1987)	Lesões cutâneas, raramente acomete o homem	Norte do estado do Pará
<i>Leishmania (V.) shawi</i> (Shaw et al, 1991)	Lesões cutâneas, raramente acomete o homem	Região amazônica
<i>Leishmania (V.) naiffi</i> (Lainson et al., 1990)	Lesões cutâneas, raramente acomete o homem	Região amazônica
Subgênero <i>Leishmania</i> (Saf'janova, 1982)	Acometimento clínico no homem	Distribuição geográfica
<i>Leishmania (L.) mexicana</i> (Biagi, 1953)	Lesões cutâneas (eventualmente, cutâneo-difusas)	México e América Central
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i> (Lainson & Shaw, 1972)	Lesões cutâneas (eventualmente, cutâneo-difusas)	América Central e regiões Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil
<i>Leishmania (L.) venezuelensis</i> (Bonfante-Garrido, 1980)	Lesões cutâneas	Venezuela
<i>Leishmania (L.) pifanoi</i> (Medina & Romero, 1959)	Lesões cutâneas (eventualmente, cutâneo-difusas)	Venezuela

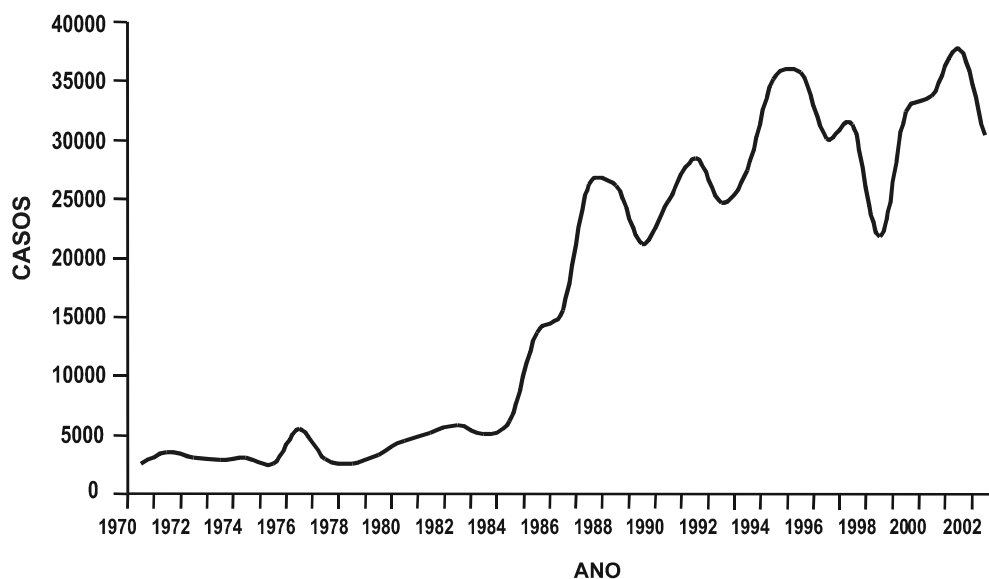
Fonte: Marzochi, Schubach & Marzochi (1999).

entre 10,45 e 22,94 por 100.000 habitantes. Ao longo deste período, observou-se uma tendência ao crescimento, registrando os CDs mais elevados nos anos de 1994/95, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 por 100.000 habitantes, respectivamente. Vale ressaltar que se registrou, no ano de 1998, uma queda significativa neste coeficiente (13,47/100.000 habitantes), em função, provavelmente, de problemas

operacionais nos estados (Secretaria de Vigilância Sanitária, SVS - Ministério da Saúde do Brasil, dados não publicados, 2004).

A evolução da doença no Brasil mostra uma expansão geográfica, sendo que, no início da década de 80, foram registrados casos em 19 (70%) Unidades Federadas e, em 1999, somente o estado do Rio Grande do Sul não registrou autoctonia da doença.

Gráfico 1. Casos notificados de leishmaniose tegumentar americana pelo Ministério da Saúde do Brasil (série histórica 1970-2002).



Em 1994, houve registro de casos em 1.861 (36,9%) municípios do país; em 1999, houve expansão da doença, sendo a mesma notificada em 2.036 (36,9%) municípios brasileiros, conforme dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS-Ministério da Saúde)^(5,6).

A análise da distribuição espacial no Brasil mostrou sua ampla dispersão, mas com forte concentração em algumas áreas, permitindo também a identificação de outras áreas de menor endemicidade ou de ocorrência apenas de casos isolados. Observa-se ainda que a região Norte do Brasil representará o grande problema da doença nos próximos anos, pois, atualmente, já contribui com o maior número de casos detectados (36,6% do total dos casos registrados no período), bem como com os coeficientes mais elevados, havendo ligeira queda em 1998, o que refletiu diretamente na redução do CD da região e conseqüentemente do Brasil (Secretaria de Vigilância Sanitária, SVS - Ministério da Saúde do Brasil, dados não publicados, 2004).

Nota-se, ainda, que o risco da população da região Norte adoecer por LTA foi de 90,0/100.000 habitantes, cinco vezes superior à média nacional (17,45/100.000 habitantes), destacando o estado do Amapá que correspondeu a 11 vezes mais. Em 85% dos municípios

da região, houve registro de casos autóctones, sendo que 100% dos municípios dos estados do Amapá, Rondônia e Roraima apresentaram autoctonia (Secretaria de Vigilância Sanitária, SVS - Ministério da Saúde do Brasil, dados não publicados, 2004).

O Centro-Oeste correspondeu à segunda maior região em coeficiente de detecção, com uma média de 38,8/100.000 habitantes, tendo apresentado os seus maiores picos nos anos de 1995 (52,0/100.000 habitantes) e 1999 (50,4/100.000 habitantes). No estado de Mato Grosso esse coeficiente foi crescente, atingindo níveis de 178,6/100.000 habitantes na década de 80, ultrapassando a 200,0/100.000 habitantes, em 1999. Nesta região, a LTA vem se expandindo. Em 1999, 64,5% dos seus municípios detectaram casos, quando comparado ao ano de 1994. Verificou-se ainda que, em Mato Grosso, 100% dos municípios tiveram registros de casos autóctones. Com a expansão das fronteiras agrícolas, esta região, principalmente os estados de Mato Grosso e Goiás, passou a ser importante rota de fixação do homem. Conseqüentemente, o padrão epidemiológico mais importante de transmissão da LTA mostrou similaridade aos da Amazônia brasileira^(5,6,23,31). Em Goiás, verificou-se também uma grande expansão da doença, passando

de 71(30,6%) municípios atingidos em 1994 para 118 (48,7%) em 1999, o que correspondeu a um acréscimo de 67%⁽²³⁾.

Na região Nordeste, os coeficientes são inferiores à região Norte e Centro-Oeste, verificando-se, entretanto, uma tendência de crescimento. Notou-se que os maiores CDs corresponderam aos anos de 1987 (28,5/100.000 habitantes), 1994 (32,5/100.000 habitantes) e 1995 (30,8/100.000 habitantes). Esta região, em 1999, contribuiu com o segundo maior número de casos registrados no país (28,8%), porém o risco da população adoecer foi de 24,4/100.000 habitantes, correspondendo a 1,4 vezes a média nacional (Secretaria de Vigilância Sanitária, SVS - Ministério da Saúde do Brasil, dados não publicados, 2004)..

Os estados que apresentaram os maiores CDs foram: Maranhão (68,47), Ceará (39,43) e Bahia (28,15/100.000 habitantes), estando suas populações com os maiores riscos de adoecer. Com relação à expansão geográfica, verificou-se um aumento gradativo no período de 1994 a 1999, quando 35,8% dos municípios apresentaram casos autóctones, destacando-se o Maranhão que apresentou um crescimento de 52% dos municípios com autoctonia, passando de 126 (92%) dos municípios em 1994 para 191 (88%) em 1999.

Quando pensamos em controle para a região Nordeste, observa-se que os padrões epidemiológicos da doença sofrem variações: estados como o Maranhão apresentam as mesmas características descritas para a região Norte; entretanto, no Ceará e na Bahia, as características dos padrões são variadas (padrão amazônico, silvestre modificado e áreas de colonização antiga). Já os demais estados apresentam padrões característicos de colonização antiga. Assim, esta variação configura-se como outro desafio, pois a implementação do estudo dos vetores flebotomíneos e também dos reservatórios considerados secundários nesta região, poderiam oferecer opções de ações de controle mais concretas^(2,5,6,12,27).

Outro importante fato a ser entendido foram os surtos epidêmicos que ocorreram nesta região, em locais que apresentam características do padrão epidemiológico da

região amazônica e também do silvestre modificado. Costa, (1986)⁽¹²⁾ descreveu um surto epidêmico de LTA na região de Corte de Pedra-Bahia (Floresta Atlântica), concluindo que “a epidemia teve início em 1984, entrando em fase de declínio em 1986, sem que fossem tomadas medidas profiláticas”. Fato similar ocorreu na Região de Buriticupu-Maranhão (Floresta Amazônica), onde, segundo Silva et al. (1979)⁽³⁶⁾, “não foi possível estabelecer a causa do início da epidemia em 1975 e nem os determinantes de seu término em 1977”.

Deve-se considerar, porém, em comunidades pequenas, que a intensidade do surto, levando à ocorrência de casos clínicos e subclínicos, pode produzir um estado de imunidade coletiva e controlar o processo. Assim, torna-se importante lembrar que o risco da infecção humana está sujeito também a outros condicionantes, tais como: história, economia e atividades sócio-políticas que determinam a forma de construção do espaço geográfico no qual as populações se instalam. O impacto gerado pela atividade humana depende das modificações introduzidas no ecossistema nativo, relacionados à quantidade, comportamento e nível de organização social de indivíduos suscetíveis, assim como da quantidade e qualidade de reservatórios, vetores e agentes etiológicos existentes^(2, 25,28,29).

As regiões Sudeste e Sul apresentaram coeficientes bem inferiores às demais regiões, com uma média de 2,4 e 4,4/100.000 habitantes, respectivamente. O estado do Espírito Santo destacou-se com o maior coeficiente de detecção, atingindo seus maiores índices em 1993 com 33,0/100.000 habitantes e, em 1999, com 30,1/100.00 habitantes. Em Minas Gerais, o coeficiente médio de detecção foi de 10,7/100.000 habitantes, registrando o seu maior valor em 1993 com 15,7/100.000 habitantes (Secretaria de Vigilância Sanitária, SVS - Ministério da Saúde do Brasil, dados não publicados, 2004).

No Sul, o estado do Paraná foi responsável por 95% dos registros de casos da região, com coeficiente médio de 6,3/100.000 habitantes, atingindo o seu maior coeficiente no ano de 1994 (15,7/100.000 habitantes). Os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina apresentaram casos esporádicos até 1995, sendo que, a

partir de 1996, Santa Catarina apresentou autoctonia ao longo dos anos, decorrente de um surto epidêmico em um dos municípios da região litorânea do Estado. Na região, o estado do Paraná vem apresentando um aumento no número de municípios com casos de LTA, sendo registrada, no ano de 1994, autoctonia em 117 (31,5%) municípios, elevando-se para 147 (36,8 %) o número de municípios atingidos no ano de 1999.

A região Sudeste apresentou uma queda gradativa no período de 1994/97, passando de 640 para 497 municípios com casos autóctones da doença. Entretanto, nos anos subsequentes, houve um acréscimo de até 7% no percentual de municípios atingidos. Essa situação pode ser atribuída a deficiências no sistema de vigilância epidemiológica. Vale ressaltar que, em 1999, os estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro foram os que apresentaram o maior percentual de municípios com casos autóctones, 54,9% e 48,3%, respectivamente (Secretaria de Vigilância Sanitária, SVS - Ministério da Saúde do Brasil, dados não publicados, 2004).

O estabelecimento de ações efetivas de controle da LTA representa um grande desafio, uma vez que essa doença apresenta grande diversidade e constantes mudanças nos seus padrões epidemiológicos de transmissão, devido às diferentes espécies de vetores, reservatórios e agentes etiológicos, associados à ação do homem sobre o meio ambiente. Segundo o Ministério da Saúde, as estratégias de controle da LTA devem ser específicas, conforme a situação epidemiológica de cada local e região, destacando-se que é fundamental o conhecimento do maior número de casos suspeitos, diagnóstico e tratamento precoces dos casos confirmados; identificação do agente etiológico circulante na área, conhecimento das áreas de transmissão e redução do contato homem vetor por meio de medidas específicas^(5,6,30,32,38,40).

Caracterização da população exposta ao risco de adquirir a LTA: comportamento como doença ocupacional

No Brasil, desde o início da colonização, o processo de povoamento foi feito visando a produzir mercadorias

para serem exportadas e, entre essas, a de maior demanda no mercado internacional. O país integrou-se, deste modo, ao circuito do capital comercial europeu logo após a sua ocupação pelos portugueses, a título de “colônia de exploração”, como fornecedor de alguns bens primários extrativos.

A partir do século XVI, o Brasil amplia a sua integração a esse circuito por meio de exportação de produtos agrícolas tropicais, iniciando com a cana de açúcar, seguida do café, cacau, dentre outros, passando a desenvolver um sistema monocultor de forma altamente ligada às grandes propriedades, às custas do desmatamento, da introdução de plantas exóticas e de formação de pastagens.

Isto criou condições sociais adversas, como a exploração do trabalhador rural, principalmente dos chamados “sem terra”^(12,13,17). Estes enfrentam dois problemas fundamentais: o primeiro, a modernização da produção que, em determinadas fases do cultivo, substitui o trabalhador pela máquina, enquanto, em outras, necessita do uso intensivo de mão-de-obra - por exemplo, na fase de desflorestamento, capina ou de colheita. Essa situação de intermitência no uso da força de trabalho incentiva a proliferação da forma de trabalho volante. O segundo problema refere-se à substituição de culturas de uso intensivo de mão-de-obra por pastagens ou lavouras mecanizadas. Assim, fazendas que ofereciam trabalho durante o ano inteiro para grande número de famílias passam a expulsá-las de suas terras por não necessitarem mais de sua mão-de-obra, fazendo com que as mesmas se desloquem para as pequenas e médias cidades^(1,13,17,28).

Esses trabalhadores compõem, historicamente, a população de maior incidência de LTA. Esta doença, que ocorre na faixa etária mais produtiva (entre 20 e 50 anos), causa sérios prejuízos à economia do país pela perda temporária ou mesmo permanente de mão-de-obra. Porém, causa prejuízos mais sérios ainda ao trabalhador que, ao pertencer a uma classe sócio-econômica menos favorecida, tem chances reduzidas de prevenção ou de tratamento, devido à escassa oportunidade de obter um diagnóstico rápido (antes da evolução da doença para formas desfigurantes e crônicas) e menores condições de se submeter ao tratamento, que é dispendioso e

freqüentemente obriga o indivíduo a suspender o próprio emprego por várias semanas^(5,6,12,13,17,28).

Outra situação desconfortável são os indivíduos que desenvolvem atividades dentro das florestas e delas extraem matéria-prima, como os extratores de látex de borracha da região amazônica. Observa-se, nesta região, um processo de desenvolvimento rápido, acarretando a exploração e clareamento de imensas áreas florestais virgens para a instalação de projetos agropecuários, construção de estradas e mineração⁽¹⁾.

As perspectivas de controle da doença na região são complexas em função da mesma comportar-se como uma zoonose, sendo o homem apenas hospedeiro acidental. Atinge indivíduos que trabalham nas áreas florestais, especialmente naquelas envolvidas em atividades de desmatamento, às vezes se comportando como doença ocupacional. Por tratar-se de matas densas de áreas tropicais chuvosas, o conhecimento da biologia e dos hábitos de alimentação das várias espécies de vetores flebotomíneos poderá contribuir para a prevenção da infecção. Outra possibilidade seria o desenvolvimento de vacinas e a utilização dos cuidados individuais, que é de difícil implementação na prática^(1,5,6,27).

Caracterização da LTA como doença metaxênica: destaque para os agentes etiológicos, vetores, reservatórios e distribuição espacial

A mudança ambiental resultante das atividades humanas tem modificado o perfil epidemiológico da doença, tanto nas áreas onde a transmissão é florestal, em focos enzoóticos naturais (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*) como nas áreas onde a transmissão é peri-urbana e peri-domiciliar, envolvendo reservatórios domésticos (*L. chagasi*, *L. braziliensis* e *L. venezuelensis*).

Conforme dados do Ministério da Saúde^(5,6), as espécies de leishmânias responsáveis pela LTA de interesse médico sanitário no Brasil, são:

Leishmania amazonensis - tem distribuição não só pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas,

Pará e Maranhão), particularmente em áreas de “Igapó” e de floresta tipo “várzea”, mas também está presente no Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais) e Centro-Oeste (Goiás). Tem como hospedeiros naturais: marsupiais (*Didelphis* sp.) e roedores, principalmente “rato soia” (*Proechimys* sp.), além do *Oryzomys*, que apresentam, em geral, somente a infecção, com parasitos na pele aparentemente normal. Os vetores são espécies do complexo *Lutzomyia flaviscutellata*, de hábitos noturnos e voo baixo, sendo pouco antropofílico^(25,26,37,39).

Leishmania guyanensis – aparentemente limitada ao norte da bacia amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará). Encontra-se associada à floresta de terra firme, não inundável. Vários mamíferos selvagens são incriminados como hospedeiros naturais, principalmente a preguiça de dois dedos (*Choleopus didactylus*) e o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), além de marsupiais (*Didelphis marsupialis*) que passam a conviver próximo ao homem após os desmatamentos. O vetor incriminado, *Lutzomyia umbratilis* (35% dos flebotômios capturados), costuma pousar durante o dia em troncos de árvores, ataca o homem com grande intensidade quando perturbado e pode invadir habitações próximas à mata até 80 metros^(25,26,40).

Leishmania braziliensis - tem ampla distribuição, da Amazônia ao sul do país, sendo que o estado do Ceará contribui com a maioria dos casos, seguido da Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Goiás, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Na Amazônia, a infecção é encontrada em áreas de selva, de terra firme. Os hospedeiros naturais são desconhecidos e o único vetor conhecido é o *Psychodopigus wellcomei* (Serra dos Carajás), altamente antropofílico, picando o homem mesmo durante o dia e com grande atividade na estação úmida, em florestas de terra firme^(5,6,12,31,32,37).

No estado da Bahia (Três Braços e Corte de Pedra), o flebotomíneo incriminado é o *Lutzomyia whitmani*. Este

pode ser encontrado próximo ou invadindo as casas, em plantações de bananeiras, de cacau e, raramente, em áreas florestais, embora se admita a transmissão nos ambientes peri-domiciliares e florestais. Em relação aos reservatórios naturais, foram encontrados espécimes raras de *Proechimys* sp. infectados nessa região^(2,12,13). No estado do Ceará (Serra do Baturité), o flebotomíneo responsável pela transmissão é o *Ps. Wellcomei*, tendo como principal forma de transmissão a peri-urbana, longe das matas onde está associada à *Lu. whitmani* e *Lu. migonei*. Animais como o cão e o jumento podem apresentar lesões ulceradas, vegetantes ou crostosas, cutâneas ou mucosas, únicas ou múltiplas. Esses animais são os únicos que reproduzem uma infecção semelhante à doença humana^(5,6,20,27).

Em relação à distribuição espacial da doença, recentemente, o Ministério da Saúde e a FIOCRUZ/RJ, através de um intercâmbio, realizaram um estudo no qual identificaram as unidades territoriais de importância epidemiológica, caracterizando-as por: circuitos de produção da doença para o nível nacional; pólos e pólos circunscritos para o estadual, destacando que os pólos estaduais, quando confluentes, formam os circuitos nacionais. Foram identificados vinte e seis circuitos de LTA no período de 1998 a 2000, nas diferentes regiões, destacando que um circuito pode ser composto de uma ou mais unidades federadas (Secretaria de Vigilância Sanitária, SVS - Ministério da Saúde do Brasil, dados não publicados, 2004) (Figura 1).

Dos 37.066 casos notificados em 2001, um percentual de 71,4% ocorreram dentro dos limites dos circuitos do triênio anterior. Em relação aos demais, além da observação de casos isolados, puderam ser registradas novas áreas de adensamento, sugerindo novos circuitos da endemia (Tabela 1).

No estado da Bahia a doença tem importância secular, pois desde o início de sua colonização existem registros de casos^(12,13). Na década de 70 e 80, foram desenvolvidos diversos estudos na região cacaueira (Três Braços e Corte de Pedra), que serviram de modelo para o entendimento de alguns aspectos relacionados à epidemiologia clínica e terapêutica da doença. Desde a década de 80, os registros de casos

de LTA confirmam o Estado como um dos líderes, juntamente com o Maranhão e Ceará, da região Nordeste, mantendo-se com uma média de 3.000 casos anuais^(2,5,6,12,13).

Nos anos 1998/2000, o Ministério da Saúde identificou 4 circuitos de produção da doença no Estado (Figura 1), a saber: Vale do Jequitinhonha (MG/BA), Chapada Diamantina, Região Cacaueira da Bahia, Greg de Coribe. Tais circuitos concentram 85% dos casos no Estado. Nota-se que a mobilidade populacional nestes circuitos pode estar desempenhando importante papel na disseminação da LTA, uma vez que pessoas, ou animais domésticos, adquirindo a infecção ao migrarem para outra região e instalando-se no local, podem provocar áreas de desequilíbrio no ambiente, facilitando o ciclo de transmissão antroponótico na região, instalando-se a infecção ou a doença nessas áreas anteriormente livres da doença (Secretaria de Vigilância Sanitária, SVS - Ministério da Saúde do Brasil, dados não publicados, 2004).

Uma das regiões endêmicas em destaque é a do sudoeste que, juntamente com a região sul, formam o maior circuito de produção de LTA no Estado. A Secretaria da Saúde do Estado da Bahia mantém, em um dos municípios da região (município de Jequié), um centro de referência (Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva-CERDEPS/PIEJ), que é responsável pelo controle da endemia, desempenhando papel importante como pólo disseminador de conhecimentos sobre a doença nos municípios de abrangência do mesmo (Nascimento, E.G.; informação pessoal, 2003).

Leishmaniose Visceral Americana

No Brasil, a leishmaniose visceral americana (LVA), também conhecida como calazar, comporta-se como uma zoonose rural, peri-urbana mas que nas duas últimas décadas atingiu áreas urbanas. A difusão desta protozoose poderia ser explicada fundamentalmente por fatores climáticos e sócio-econômicos, tendendo a aumentar com as crises

Tabela 1. Atributos dos circuitos de produção de leishmaniose tegumentar americana no Brasil, média 1998 a 2000 e 2001.

Total de casos no Brasil (ano 2001)	37.066
Total de casos nos circuitos (ano 2001)	26.476
% de casos nos circuitos (ano 2001)	71,4
Média de casos no período 1998-2000 nos circuitos	20.616
Incremento percentual dos casos nos circuitos (Med. 1998 –2000 e 2001)	28,4
Número total de municípios no Brasil (base 1997)	5.510
Total de municípios no Brasil com casos em 2001	2.000
Total de municípios nos circuitos	1.111

Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS)-Ministério da Saúde (2001).

Figura 1. Circuitos de produção de leishmaniose tegumentar americana (LTA) segundo o Ministério da Saúde (2000-2002), Brasil.



econômicas do país ⁽⁷⁾. A expansão deu-se para as regiões Norte (Roraima), Centro-Oeste e Sudeste brasileiro como mostra a Figura 2.

Segundo o Ministério da Saúde, em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de LVA somaram 48.455 casos, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Nos últimos dez anos, a média anual de casos no país foi de 3.156 casos e a incidência de dois casos/100.00 hab ⁽⁷⁾ (Gráfico 2).

Desde 1979, vem ocorrendo baixa precipitação pluvial no Nordeste brasileiro, originando a seca em algumas regiões, seca esta que não chega a eliminar o vetor, o flebótomo, pois este resiste à higrometria mínima. No entanto, leva a um incremento da fome,

diminui a resistência humana e canina e provoca as correntes migratórias ^(11,14,15). Esses movimentos migratórios têm aumentado, e pessoas acompanhadas de animais domésticos, principalmente do cão (os cães acompanham as famílias em suas migrações, sobretudo no Nordeste), dirigem-se para regiões de maior potencial financeiro, livres da parasitose, mas que se instalará se existir o vetor *Lutzomyia longipalpis* ^(11,18).

Dependendo da interação de vários fatores, particularmente dos hábitos dos flebotomíneos, das características ecológicas da área e do tipo de hospedeiros canídeos, sejam, domésticos ou silvestres, a doença pode apresentar-se sob o ponto de vista epidemiológico em duas modalidades: LVA silvestre e LVA doméstica ou peri-doméstica ^(33,41).

Figura 2. Distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral americana por município, Brasil, 2002.

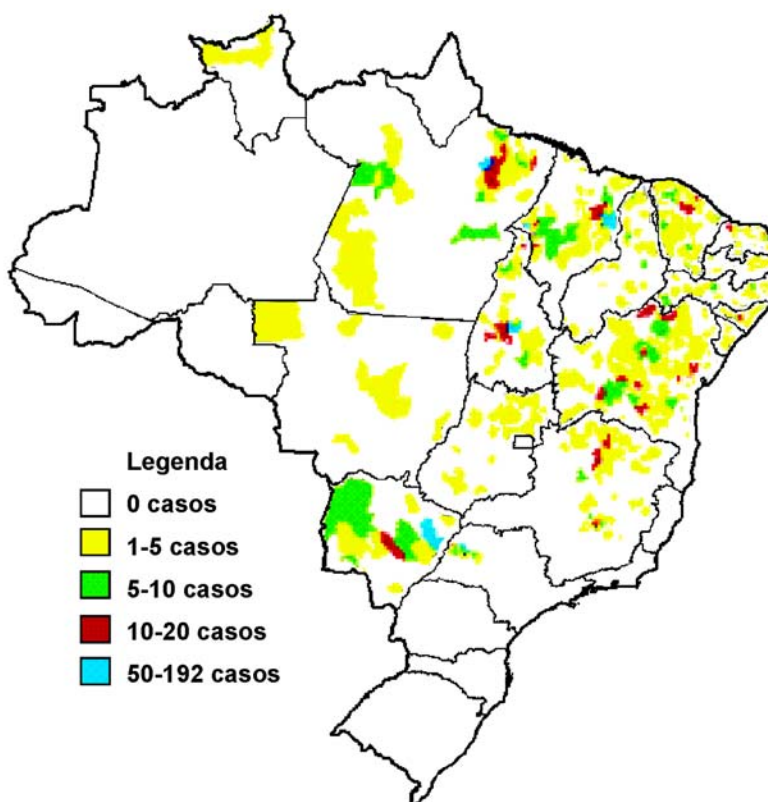
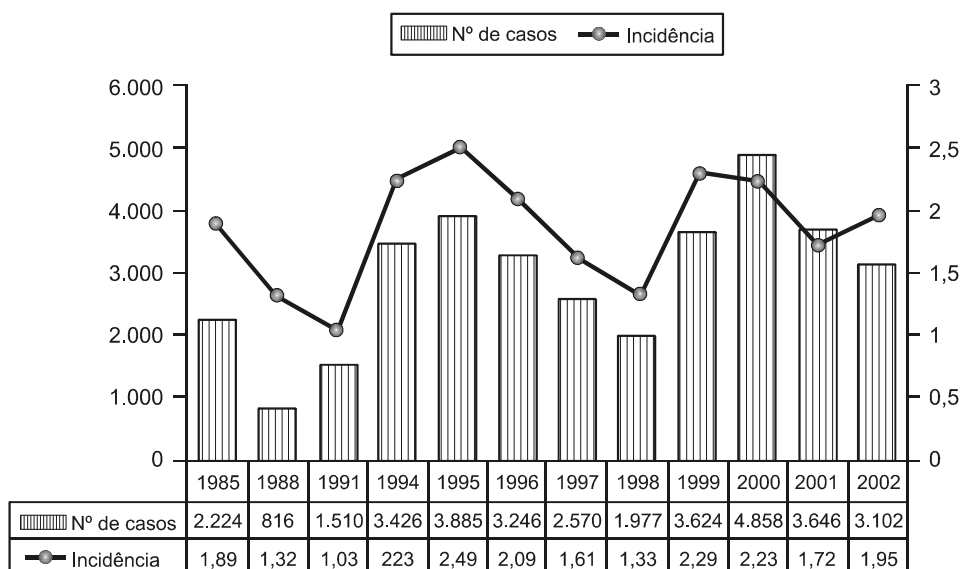


Gráfico 2. Número de casos e coeficiente de incidência de leishmaniose visceral americana, Brasil – 1985-2002.



Fonte: SINAN-CONVEV/CGDT/DEVP/SVS MS.

Na LVA silvestre, está envolvido o vetor *Lu. longipalpis* e o reservatório silvestre (raposa) que habitam nichos ecológicos raramente visitados pelo homem. Este tipo de ciclo ocorre com mais freqüência na floresta amazônica ou no sertão nordestino^(7,11,18).

Na modalidade doméstica ou peri-doméstica, o ciclo epidemiológico geralmente ocorre no ambiente rural ou peri-urbano, envolvendo o homem, o cão doméstico e o vetor. Este tipo epidemiológico ocorre com mais freqüência na região Nordeste, onde o cão infectado representa a principal fonte de infecção para o vetor, devido ao intenso parasitismo cutâneo observado nesse animal^(11,14,15,18).

Estas duas modalidades podem se sobrepor quando o homem e o cão, ao penetrarem no ambiente silvestre, se infectam e, ao voltarem para o domicílio, servem de fonte de infecção para os flebotomíneos locais, iniciando o foco domiciliar^(4,10). Por outro lado, quando as raposas se aproximam das residências à procura de alimentos, principalmente pequenas aves domésticas como galinha, servem de fonte de infecção do vetor durante o período em que estiverem circulando pela área^(14,15,18).

A dinâmica populacional de vetores nas doenças metaxênicas assume aspecto relevante, uma vez que o vetor representa o elo essencial entre infectante e susceptível^(9,11,14,15,34).

Costa et al. (1990)⁽¹¹⁾ explicam esta dinâmica através de um modelo proposto de padrões de transmissão da LVA para a região Meio-Norte (Piauí e Maranhão), onde são destacados 3 padrões de transmissão:

Padrão endemo-epidêmico: presença de casos humanos de LVA em regiões de pés-de-serra ou boqueirões do semi-árido, apresentando o cão e a raposa como reservatórios; o fenômeno da seca acompanhado da migração de pessoas e animais para as cidades ou para os vales de rios é sempre uma constante;

Padrão epidêmico: a precariedade das condições de vida nas periferias urbanas propicia a eclosão de surtos epidêmicos, tanto pela proliferação do vetor secundário (*Lu. longipalpis*), da abundância de fontes alimentares, proximidade de criadouros, quanto pela circulação do agente etiológico (*L. chagasi*) a partir de cães e pessoas infectadas;

Padrão epidêmico rural dos vales e dos rios: nas escassas coleções de água, acumulam-se reservatórios domésticos (cães - *Canis familiares*) e silvestres

(raposas - *D. vetulus*, *C. thous*; gambás - *Didelphis* sp.), além de outros animais domésticos infectadas e suscetíveis, propiciando o aparecimento de casos de LVA nessas áreas.

Esses efeitos migratórios foram importantes para explicar a disseminação da LVA para outros estados brasileiros como o Rio de Janeiro (1979), São Paulo (1981), Minas Gerais (1994) e, mais recentemente, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul^(3,7,9,10).

Em nosso país, a faixa etária mais predisposta a desenvolver a LVA são os menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de 5 anos. O sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (60%)^(3,4,7). A razão da maior susceptibilidade das crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular às vezes agravada pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peri-domicílio. Por outro lado, o envolvimento do adulto tem repercussão significativa na epidemiologia da LVA, pelo desenvolvimento de todas as manifestações clínicas (infecção, forma oligossintomática, período inicial e período de estado)^(3,4,33,41).

Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados da doença ocorreram na região Nordeste. À medida que a doença se expandiu para as outras regiões atingindo áreas urbanas e peri-urbanas, esta situação vem se modificando e, no período de 2000 a 2002, a região Nordeste já apresentava uma redução para 77% dos casos humanos do país⁽⁷⁾.

Caracterização da LVA como doença metaxênica: destaque para o agente etiológico, vetores e distribuição espacial

Estudos realizados no Brasil identificaram a *Leishmania (L.) chagasi* como a responsável pelos casos de leishmaniose visceral em todas as regiões brasileiras. Tem como hospedeiros naturais no ambiente silvestre, as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis*

albiventris). No Brasil, a raposa foi encontrada infectada nas regiões Nordeste, Sudeste e Amazônica, enquanto que o didelfídeo, na região Nordeste e Norte. Na área urbana, o cão (*Canis familiares*) é a principal fonte de infecção. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem^(7,10,14,15).

Os vetores responsáveis pela transmissão da *L. (L.) chagasi* ao homem são as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A primeira é considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) chagasi* no Brasil e, recentemente, *Lu. cruzi*, foi incriminada como vetores no estado do Mato Grosso. Não ocorre transmissão direta da *L. (L.) chagasi* de pessoa a pessoa^(4,7,11, 18).

No Brasil, a distribuição geográfica do *Lu. longipalpis* é ampla e parece estar em expansão. Esta espécie é encontrada em quatro das cinco regiões geográficas: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste. Nas regiões Norte e Nordeste eram encontradas originalmente nas matas participando do ciclo primário de transmissão da doença. Progressivamente houve adaptação desse inseto para o ambiente rural e sua adaptação a este ambiente foi somada à presença de animais silvestres e sinantrópicos. Recentemente, ao final da década de 80, verificou-se a adaptação deste vetor aos ambientes urbanos, em periferias de grandes centros, principalmente na Região Sudeste, podendo ser encontrados no peri-domicílio, em galinheiros, chiqueiros, canil, paiol, entre outros ambientes, e também no intradomicílio^(7,18,19,34).

Em função das características ambientais associadas à pauperização da população, tornaram-se propícias a transmissão da *L. L. chagasi* em nosso país. Observou-se que, na década de 90, aproximadamente noventa por cento (90%) dos casos notificados de LVA ocorreram na região Nordeste. À medida que a doença se expandiu para as outras regiões e atingiu áreas urbanas e peri-urbanas, esta situação vem se modificando e, no período de 2000 a 2002, a região Nordeste já representava uma redução para 77% dos casos do país^(7,10).

Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelaram a peri-urbanização e a urbanização da LVA, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e, mais recentemente, as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO)⁽⁷⁾. As áreas de transmissão da doença no Brasil estão representadas na Figura 2.

Em virtude das características epidemiológicas e do conhecimento ainda insuficiente sobre os vários elementos que compõem a cadeia de transmissão da LVA, as estratégias de controle dessa endemia ainda são pouco efetivas e estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos, redução da população de flebotomíneos, eliminação dos reservatórios e atividades de educação em saúde. Vale destacar que as ações voltadas para o diagnóstico e tratamento dos casos e atividades educativas devem ser em todas as situações priorizadas, lembrando que as demais medidas de controle devem estar integradas para que possam ser efetivas^(7,11,18,33).

Referências Bibliográficas

1. Araújo Filho NA. Leishmaniose Tegumentar Americana e o desmatamento na Amazônia. *Acta Amazônica*. 11:187-189, 1981.
2. Barreto AC, Cuba CC, Marsden PD, Vexenat JA, De Belder M. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do estado da Bahia, Brasil. I. Leishmaniose humana. *Boletim de la Oficina Panamericana de Salud*, 90:415-424, 1981.
3. Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson Jr WD. New perspectives on subclinical form of visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*. 154:1003-1011, 1986.
4. Badaró R, Jones TC, Lourenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, Rocha H, Teixeira R, Johnson Jr WD. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 35:72-78, 1986.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de controle da leishmaniose tegumentar americana, 78 pags. 2000.
6. Brasil. Fundação Nacional de Saúde (FNS). Boletim Epidemiológico. Ano 02, Nº05, 2002.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Normas e Manuais Técnicos. Secretaria de Vigilância em Saúde. 120 pags, 2003.
8. Bray RS. Leishmaniasis. In: *Immunological investigation of tropical parasitic diseases*, edit. PorHouba, V. London: Churchill Livingstone, 65-74, 1980.
9. Caldas AJM, Silva DRC, Pereira CCR, Nunes PM, Silva BP, Silva AAM, Barral A, Costa JML. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luís-MA, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 34:445-451, 2001.
10. Caldas AJM, Costa JML, Silva AAM, Vinhas V, Barral A. Risk factors associated with asymptomatic by *Leishmania chagasi* in northeast Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 95:1-8, 2002.
11. Costa CHN, Pereira HF, Araújo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Revista de Saúde Pública*, 24:361-372, 1990.
12. Costa JML. Estudo clínico-epidemiológico de um surto epidêmico de leishmaniose tegumentar americana em Corte de Pedra-Bahia. Brasília-DF, Tese de Mestrado -Universidade de Brasília, UNB, Brasília, DF. 186 pags., 1986.
13. Costa JML, Balby ITA, Rocha EJS, Silva AR, Rebêlo JMM, Ferreira LA, Gama, MEA, Branco, MRFC, Burattini MN, Soares, NJS. Estudo Comparativo da Leishmaniose Tegumentar Americana em crianças e adolescentes procedentes das áreas endêmicas de Buriticupu (Maranhão) e Corte de Pedra (Bahia), Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 31:279-288, 1998.
14. Deane LM & Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar, no Ceara. *O Hospital*, XLVIII:79-98, 1955.
15. Deane LM & Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 4:198-212, 1962.
16. Desjeux P. Human leishmaniasis: Epidemiology and Public Health Aspects. *World Health Statistics Quarterly* 45:213-227, 1992.
17. Dourado MICE, Noronha CV, Alcântara N, Ichihara MY, Loureiro S. 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*, São Paulo, 23:2-8, 1998.

18. Evans T, Teixeira M, McCauliffe I, Vasconcelos A, Sousa A, Lima J, Pearson R. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Journal of Infectious Diseases* 166: 1124-32, 1992.
19. Genaro O, Da Costa CA, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SL, Mayrink W. Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 23:121, 1990.
20. Grimaldi Jr G, Tesh RB, MacMahon Pratt D. A review of the geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41:687-725, 1989.
21. Herrer A, Christensen HA, Beuner RJ. Epidemiological patterns of cutaneous leishmaniasis in Panama. II. Incidental occurrence of cases in non-endemic settlements. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 70:67-71, 1976.
22. Herrer A, Christensen HA. Epidemiological patterns of cutaneous leishmaniasis in Panama. III. Endemic persistence of the disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 25:54-58, 1976.
23. Hidasí Filho J, Batista SRR, Freitas LZ. Estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana em dois Municípios Goianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 34 (Suplemento III): 154, 2001.
24. Kawa H, Sabroza PC. Espacialização da Leishmaniose Tegumentar na cidade do Rio de Janeiro. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 18:2002.
25. Lainson R, Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. *Nature*, 273:596-600, 1978.
26. Lainson R. Epidemiologia e ecologia de leishmaniose tegumentar na Amazônia. *Hiléia Médica*, 3:35-40, 1981.
27. Martins L.M. Análise da associação entre a cobertura vegetal e a ocorrência de Leishmaniose Tegumentar (LT) em Buriticupu, Amazônia do Maranhão. Dissertação de Mestrado em Saúde e Ambiente, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Ma. 82 pags. 2002.
28. Medeiros ACR, Roselino AMF. Leishmaniose Tegumentar Americana: do histórico aos dias de hoje. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio De Janeiro, 74: 329-336, 1999.
29. Moreira RCR, Rebêlo JMM, Gama MEA, Costa JML. Nível de conhecimentos sobre leishmaniose tegumentar americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio De Janeiro. 18: 187-195, 2002.
30. Nascimento MDSB. Leishmaniose Tegumentar no estado de Goiás: análise dos dados epidemiológicos, clínicos e imunopatológicos de infecção humana, registrados de 1965 a 1984. *Revista de Patologia Tropical*. 15:99-214, 1986.
31. Pereira CAC, Tristão OC, Barbosa MCB, Pimentel AFM, Carvalho MTF. Leishmaniose Tegumentar Americana: mapeamento de área endêmica. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio De Janeiro, 70:254-256, 1995.
32. Rebêlo JMM, Mendes WW, Costa JML, Cavaleiro N. Nota Preliminar das espécies do Gênero *Lutzomyia*, França 1924 (Psychodidae, Phlebotominae) do estado do Maranhão, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio De Janeiro, 12:545-549, 1996.
33. Rodrigues da Silva J. Leishmaniose visceral (calazar). Rio de Janeiro. Thesis, Faculdade Nacional de Medicina, Rio de Janeiro. Serviço Nacional de Educação Sanitária, 498pags., 1957.
34. Senra MS, Pimentel PSR, Sousa PEFP. Leishmaniose visceral em Santarém, Para. Aspectos gerais do controle. Inquérito sorológico de cães e tratamento dos casos humanos. *Hiléia Médica*. 7:23-32, 1986.
35. Sessa PA, Barros GC, Mattos EA, Carias VRD, Alencar JTA, Delmaestro D, Coelho CC, Falqueto A. Distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar americana no estado do Espírito Santo-Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 18:237-241, 1985.
36. Silva AR, Martins G, Melo JEM, Araújo, JP, Mendes, JR, Mendes, MG. Surto epidêmico de leishmaniose tegumentar americana ocorrido na colonização agrícola de Buriticupu (estado do Maranhão), Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 21:43-50, 1979.
37. Taniguchi HH, Tolenzano JE, Corrêa FMA, Moraes RHP, Veiga RMO, Marassá AM. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no estado de São Paulo - Brasil. I - composição da fauna flebotomínica no município de São Roque, região de Sorocaba. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 51:23-30, 1991.
38. Teodoro U, Kühl JB, Rodrigues ME, et al. Flebotomíneos coletados em matas remanescentes e abrigos de animais silvestres de zoológico no perímetro urbano de Maringá, Sul do Brasil. Estudo preliminar. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31:517-522, 1998.
39. Tolezano JE. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 89:427-434, 1994.
40. World Health Organization, Control of the Leishmaniasis. Geneva, WHO, (Technical Report Series 703), 158pags., 1990.
41. World Health Organization. Manual de controle da leishmaniose visceral. Organização Pan-Americana, Genebra, 89 pags., 1997.

Influência da Saliva de Flebotomíneos na Leishmaniose Experimental e Humana

Role of Sand Fly Saliva in Experimental and Human Leishmaniasis

Clarissa Teixeira^{1,2}, Regis Gomes^{1,2}, Manoel Barral-Netto^{1,2,3}, Aldina Barral^{1,2,3}, Cláudia Brodskyn^{1,2,3}
 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ¹; Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA²; Instituto de
 Investigação em Imunologia; Salvador, BA, Brasil

A leishmaniose é transmitida pela picada do vetor flebotomíneo infectado. A saliva deste flebótomo possui um repertório de moléculas que modulam as respostas hemostática, inflamatória e imunológica do hospedeiro. Os eventos iniciais entre a leishmania e o sistema imune do hospedeiro estão diretamente relacionados ao desenvolvimento da infecção ou à proteção contra o parasita. Os componentes da saliva influenciam diretamente essas interações. Estes componentes têm sido bastante explorados e vários trabalhos na literatura têm estudado estes aspectos. Nesta revisão, discutimos as contribuições da literatura, que procuram esclarecer a influência da saliva na resposta imune inicial anti-leishmania do hospedeiro e no estabelecimento da infecção, trazendo novas perspectivas para o tratamento, controle e profilaxia da doença.

Palavras-chave: Vetor, saliva, *Leishmania*, infecção.

Leishmaniasis are transmitted to their vertebrate host by infected phlebotomine sand fly. The saliva from these insects contains a repertoire of pharmacologically active molecules that are able to interfere with the host's haemostatic, inflammatory and immune responses. The initial events between Leishmania and the host's immune response are directly related to disease progression or protection against the parasite, and saliva contributes directly to these interactions. Recent work in the literature has described these aspects, and these interactions have been extensively investigated. In this literature review, we have identified reports that explain the role of saliva in the initial immune response against Leishmania in the host and against infection, bringing new perspectives for treatment, prophylaxis and disease control.

Key words: Vector, saliva, *Leishmania*, infection.

As leishmanioses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* constituem um problema sério de saúde pública em várias regiões do mundo. Os flebotomíneos, vetores das leishmanioses, ingerem os parasitas quando picam o hospedeiro vertebrado infectado. As amastigotas, que vivem de forma intracelular no hospedeiro vertebrado, transformam-

se em promastigotas no intestino do vetor, diferenciando-se em promastigotas metacíclicas por volta de uma semana. A infecção por leishmania ocorre quando a fêmea, ao realizar o repasto sanguíneo, necessário para maturação dos ovos, inocula o parasita no hospedeiro vertebrado ⁽¹⁵⁾. Durante esse processo, o conteúdo da glândula salivar é depositado no local da picada, promovendo o bloqueio de mecanismos hemostáticos do hospedeiro que beneficiam o vetor na obtenção do alimento. Recentemente, a importância dos componentes da glândula salivar dos flebotomíneos em estabelecer uma infecção eficiente por leishmania, tem se tornado mais clara, trazendo novas perspectivas para o controle da doença.

Recebido em 22/02/2005 Aceito em 27/05/2005
 Endereço para correspondência: Dra. Cláudia Brodskyn, R.
 Waldemar Falcão, 121, 40296-710 Salvador, BA, Brasil, Tel.: 55
 71 3356 4320; FAX: 55 71 3356 4320, ramal: 261.
 E-mail: brodskyn@cpqgm.fiocruz.br

Gazeta Médica da Bahia 2005;75(1):Jan-Jun:18-23.
 © 2005 Gazeta Médica da Bahia (ISSN 0016-545X).
 Todos os direitos reservados.

Caracterização dos Componentes Salivares de Flebótomos

A obtenção de sangue como alimento para o vetor flebotomíneo tem como maior desafio enfrentar as dificuldades impostas pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. A hemostasia, processo utilizado pelo hospedeiro para evitar a perda de sangue, é controlada por componentes anti-coagulantes, anti-agregação plaquetária e vasodilatadores da saliva^(13, 14, 18). Algumas dessas moléculas já foram caracterizadas, como a hialuronidase, que auxilia na difusão de outros componentes; a apirase, prostaglandina E2 (PGE2) e prostaciclina, que bloqueiam a agregação plaquetária e promovem a dilatação sangüínea. Dentre as substâncias vasodilatadoras, o maxadilán, presente apenas na saliva de *L. longipalpis*, foi caracterizado como um potente vasodilatador⁽¹⁰⁾. Estas moléculas, com funções redundantes e sinérgicas, têm como objetivo principal a formação do “lago sangüíneo” para obtenção de alimento por parte dos flebótomos⁽¹³⁾.

Devido à importância da saliva no repasto sangüíneo dos flebotomíneos, na imunidade do hospedeiro e transmissão do patógeno, a caracterização dos componentes salivares responsáveis por essas atividades é necessária para compreender os mecanismos de ação bem como desenvolver novas estratégias para bloquear a transmissão do patógeno. A purificação dos componentes salivares tem sido um desafio devido à pequena quantidade de proteínas da glândula salivar. Muitas proteínas salivares com atividades anti-hemostáticas, inflamatórias e imunomodulatórias foram isoladas seguindo abordagens bioquímicas e da biologia molecular.

Novas abordagens experimentais encontram-se em desenvolvimento, na tentativa de se caracterizar moléculas presentes nas glândulas salivares dos vetores. As abordagens experimentais têm mudado do estudo de uma única molécula presente na glândula salivar para o estudo do complexo total de genes e proteínas secretadas pelos artrópodes, usando uma abordagem de “alta performance” (high-throughput). A idéia é combinar um protocolo de seqüência massiva de bibliotecas de cDNA da glândula salivar, uma

abordagem proteômica para isolar um grande grupo de proteínas salivares e ensaios de alta performance funcionais e biológicos para analisar e testar as atividades biológicas destas novas moléculas^(20,22). Estudos de alta performance genômicos e proteômicos têm resultado na descoberta de genes e proteínas que não foram anteriormente descritas em artrópodes. Essas novas abordagens permitem não somente a caracterização de fatores salivares envolvidos em homeostase e inflamação, mas também a identificação de novas proteínas salivares, cujas funções biológicas ainda não são conhecidas.

Outra alternativa para a genômica funcional é o uso da vacinação de DNA. A obtenção de plasmídeos contendo um promotor e cDNAs selecionados que podem ser injetados no animal para a indução de uma resposta imune seria mais eficiente do que produzir grandes quantidades de uma proteína recombinante para injetar em animais para produção de anticorpos⁽²¹⁾.

O Papel da Saliva em Modelos Experimentais

As proteínas salivares do vetor têm capacidade de modificar a resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro. Como consequência, o parasita que é inoculado na derme durante a alimentação é favorecido pela presença da saliva, já que a mesma é capaz de exacerbar a infecção por leishmanias em modelos murinos experimentais. A co-inoculação do sonificado de glândula salivar (SGS) de *Phlebotomus papatasi* com *Leishmania major* na pata e, mais recentemente, na derme da orelha de camundongos, resultou em uma exacerbação dramática da lesão^(3,19). A *Leishmania braziliensis*, que normalmente não leva à infecção mesmo em camundongos suscetíveis como BALB/c, quando co-inoculado com SGS de *Lu. longipalpis* resultou em lesões cutâneas progressivas com a presença de macrófagos densamente parasitados e persistência de granulócitos^(6,11,16).

Os componentes presentes na saliva dos flebotomíneos também apresentam atividade imunogênica, induzindo à produção de anticorpos contra diferentes proteínas. O exato papel desses

anticorpos na exacerbação ou proteção à infecção por leishmaniasse ainda não está totalmente esclarecido. Estudos têm sugerido um possível mecanismo de bloqueio na transmissão da leishmaniasse. Animais expostos a picadas de flebótomos ou inoculados com o SGS desenvolvem elevados níveis de anticorpos IgG anti-saliva^(3,7,9,21,23). Recentemente, nosso grupo mostrou que camundongos BALB/c expostos a repetidas picadas de *Lu. Longipalpis*, transmissor da *L. chagasi*, produz anticorpos anti-saliva, além de um intenso infiltrado inflamatório⁽¹⁷⁾. Neste estudo, observou-se um predomínio de IgG, particularmente IgG1, mas não de IgG2a e IgG2b anti-saliva (Figura 1). A IgG total presente nesses animais reagiu predominantemente com três bandas protéicas presentes no SGS de *L. longipalpis* (16, 44 e 45 kDa). A inoculação de soro proveniente desses animais picados por *L. longipalpis* e previamente incubado com SGS do mesmo vetor, provocou uma resposta inflamatória inicial com a presença quase que exclusiva de neutrófilos, sugerindo a participação de imunocomplexos em gerar uma resposta inflamatória (Figura 1). A pré-exposição a picadas de *P. papatasi* ou inoculação do SGS em camundongos foi capaz de bloquear o estabelecimento da infecção por *L. major*^(3,9,21). Ghosh & Mukhopadhyay (1998)⁽⁷⁾ atribuem aos anticorpos anti-saliva a dificuldade do *P. argentipes* em realizar um eficiente repasto sanguíneo em hamsters imunizados com picadas deste mesmo vetor. A percentagem de engorgitamento sanguíneo diminui e a mortalidade dos flebótomos aumenta à medida que os níveis de anticorpos anti-saliva aumentam nesses animais.

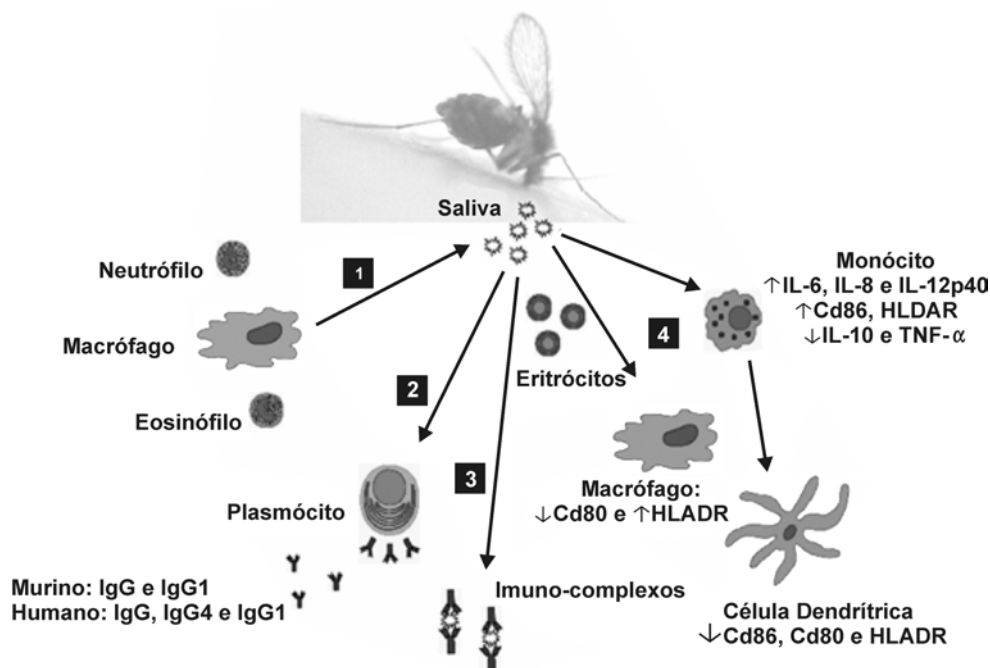
Exposições repetidas à saliva do flebótomo também levam ao desenvolvimento de imunidade celular no hospedeiro contra os produtos salivares, caracterizada por uma reação de hipersensibilidade tardia (RHT) com a presença de células inflamatórias recrutadas para o local da picada. Este recrutamento é um fator importante no estabelecimento da infecção por leishmaniasse, já que este evento facilitaria a penetração e crescimento do parasita no interior destas células. O desenvolvimento de RHT facilitaria também a alimentação do flebótomo. Observou-se que fêmeas

alimentam-se mais rapidamente em hospedeiros que desenvolvem reação de hipersensibilidade tardia; o que pode refletir uma adaptação do vetor à resposta imune do hospedeiro^(4,9).

A saliva também está envolvida no processo inflamatório inicial no hospedeiro. Utilizando o modelo do bolsão de ar inflamatório, temos observado que a saliva de *L. longipalpis* induz a um maior recrutamento de neutrófilos, eosinófilos e, principalmente, macrófagos, quando comparados à salina ou LPS (dados não publicados). O aumento significativo no recrutamento de macrófagos na presença da saliva está relacionado à presença de CCL2/MCP-1, quimiocina recrutadora de macrófagos. Entretanto, este efeito é bloqueado pela pré-incubação da saliva com anticorpos anti-SGH em animais previamente expostos a picadas de *L. longipalpis*. Utilizando este mesmo modelo, observamos um aumento no número de células recrutadas na presença de *L. chagasi*, ou *L. chagasi* mais saliva (dados não publicados). Estes resultados indicam que a saliva contribuiria para uma intensa reação inflamatória no local da picada, atraindo um maior número de possíveis células hospedeiras para a entrada do parasita. Esta atividade pró-inflamatória da saliva também já havia sido observada na saliva de *P. duboscqi* e *P. papatasi*^(1,25). O recrutamento de macrófagos resulta em benefício ao hospedeiro ou à leishmaniasse que dependerá da predominância de macrófagos ativados ou moléculas que causem desativação.

Outro aspecto relevante relacionado ao desenvolvimento de uma RHT é a proteção contra a leishmaniasse em animais que desenvolvem preferencialmente essa reação. Assim, a RHT tornaria o local um ambiente inóspito para o estabelecimento da infecção pela leishmaniasse, ou modificaria o micro-ambiente, contribuindo para o desenvolvimento dos eventos iniciais que iriam influenciar a resposta imune do hospedeiro contra a leishmaniasse. Usando uma abordagem de alta performance, Valenzuela et al. (2001)⁽²¹⁾ isolaram um grande número de proteínas salivares e genes do vetor *Phlebotomus papatasi* e encontraram uma proteína de 15 KDa, denominada PsSP115, capaz de bloquear a transmissão da *L.*

Figura 1. Efeitos da saliva de *Lutzomyia longipalpis* no hospedeiro vertebrado. (1) Infiltrado inflamatório, (2) resposta imune humoral, (3) formação de imuno-complexos e (4) regulação da expressão de moléculas co-estimulatórias e citocinas nas células apresentadoras de antígenos.



major. Assim, animais imunizados com a proteína ou o plasmídeo contendo a sequência SP15, tornaram-se resistentes a um desafio posterior constituído de parasita mais saliva. Os animais imunizados apresentaram uma intensa resposta celular RHT e alta produção de anticorpos. Os autores verificaram ainda que camundongos, mesmo deficientes de células B, quando imunizados com o plasmídeo, mostraram proteção contra um desafio posterior, sugerindo que a resposta imune celular, caracterizada por RHT, recruta células inflamatórias para o sítio da infecção, como, por exemplo, macrófagos ativados, produzindo NO, radicais livres de oxigênio e IL-12, criando um ambiente inóspito para a leishmania.

A caracterização de um grande número de proteínas salivares e seus respectivos cDNAs permitem-nos testar grande quantidade de candidatos em um sistema determinado. Outra vantagem refere-se à utilização da vacinação de DNA para a busca de candidatos à

vacina, através da produção de proteínas nativas no animal injetado *versus* o uso de proteínas recombinantes. A quantidade de DNA requerida para vacinação é muito menor do que aquela capaz de induzir a uma resposta imune quando da utilização de proteínas recombinantes. Assim, esse tipo de abordagem está acelerando o estudo de proteínas salivares dos vetores transmissores de patógenos. Genes funcionais, previamente não relatados na saliva dos artrópodes, estão agora sendo descritos. Esse tipo de modelo experimental deve contribuir no desenvolvimento de vacinas para doenças transmitidas por vetores.

Dados preliminares do nosso laboratório mostraram que, construções de cDNAs provenientes da glândula salivar de *L. longipalpis*, foram capazes de induzir a uma resposta imune celular e/ou humoral contra antígenos da glândula de *Lu. longipalpis* em hamsters e BALB/c. Além disso, algumas construções de cDNA

foram capazes de proteger animais desafiados com *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Essas construções de cDNA, que resultaram em proteção, também foram capazes de induzir à reação de RTH nos animais imunizados (dados não publicados).

O Papel dos Componentes Salivares no Homem

Estudos em nosso laboratório sugerem que, em áreas endêmicas para leishmaniose, a exposição a picadas de flebótomos não infectados pode influenciar na epidemiologia da doença. Indivíduos provenientes de áreas não endêmicas correriam um maior risco de desenvolver formas mais graves de leishmaniose, uma vez que seriam imunologicamente “naives”, não somente à leishmania, mas também à saliva do flebótomo. Recentemente, Barral et al. (2000)⁽²⁾ e Gomes et al. (2002)⁽⁸⁾, desenvolvendo estudos em uma área endêmica para leishmaniose visceral (LV), demonstraram a presença de anticorpos anti-saliva de *Lu. longipalpis* em soros de crianças que residem no mesmo local (Figura 1). Uma forte correlação foi encontrada entre altos níveis de anticorpos IgG anti-saliva e uma resposta de hipersensibilidade tardia (RHT) anti-leishmania⁽²⁾, sugerindo que anticorpos anti-saliva de flebótomos no homem podem servir como marcadores importantes na exposição a vetores das leishmanioses nessas áreas. Estas informações podem ser utilizadas de diversas formas, uma delas seria na identificação da distribuição espacial dos flebótomos em uma determinada área, auxiliando no direcionamento do controle do vetor e da doença. Outra forma seria como marcador de proteção. Indivíduos residentes em uma área para LV que são RTH positivos para antígenos de leishmania e, portanto, estariam protegidos contra a infecção, desenvolvem uma resposta de anticorpos IgG anti-saliva de *Lu. longipalpis*. Por outro lado, indivíduos da mesma área que possuem somente resposta sorológica positiva para antígenos de leishmania, RHT anti-leishmania negativo (não protegidos), apresentam baixos níveis de anticorpos anti-saliva. No soro das crianças que convertem o RHT para leishmania, foram detectadas,

principalmente, as subclasse IgG1 e IgE⁽⁸⁾. A IgG1 tem sido relacionada a uma resposta Th1 no homem, enquanto que o aumento de IgE sugere o desenvolvimento de uma resposta de hipersensibilidade imediata, já que é considerada como marcador de resposta do tipo Th2. Esse tipo de resposta mista (Th1/Th2) tem sido relatado em indivíduos expostos a picadas de outros vetores. A reação se inicia com RHT, seguida de uma reação de hipersensibilidade imediata, sendo finalizada com dessensibilização⁽¹²⁾. Os antígenos salivares reconhecidos pelos anticorpos anti-saliva presentes nos soros dos indivíduos da área endêmica estão dispostos respectivamente em um grupo de proteínas com pesos moleculares de aproximadamente 45, 44, 43, 35, 27 e 16 kDa⁽⁸⁾.

A saliva também exerce um efeito direto sobre células apresentadoras de antígenos. O SGS de *Lu. longipalpis* foi capaz de inibir a produção de IL-10 e TNF- α e elevar a produção de IL-6, IL-8 e IL-12p40 por monócitos e células dendríticas humanas estimuladas com LPS (Figura 1). A expressão de moléculas co-estimulatórias, importantes na ativação e manutenção da resposta de linfócitos T, também foi alterada em monócitos (elevação de CD86 e HLA-DR) e macrófagos (redução de CD80 e elevação de HLA-DR). A redução na expressão dessas moléculas foi observada na diferenciação de células dendríticas e na maturação induzida por CD40L. A pré-incubação da saliva com anticorpos anti-SGH bloqueou os efeitos da saliva anteriormente descritos, evidenciando a importância dos anticorpos na neutralização dos possíveis efeitos deletérios da saliva ao sistema imune do hospedeiro⁽⁵⁾.

Em conclusão, o estudo da saliva em modelos experimentais ou *in vitro* tem trazido novos esclarecimentos com relação ao estabelecimento da infecção. Estes novos aspectos também abrem novas perspectivas quanto a possíveis novos candidatos para a construção de uma vacina eficaz. A utilização de vacinas de DNA poderá ser uma excelente alternativa na indução de uma resposta imune eficaz contra produtos da saliva destes vetores, bloqueando conseqüentemente a transmissão da leishmania veiculadas por estes insetos.

Referências Bibliográficas

1. Anjili C, Mbatia P, Mwangi R, Githure J, Olobo J, Robert L, Koech D. The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: *Psychodidae*) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Tropica* 60: 10097-10100, 1995.
2. Barral A, Honda E, Caldas A, Costa J, Vinhas V, Rowton E, Valenzuela J, Charlab R, Barral-Netto M, Ribeiro J. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg* 62: 740-745, 2000.
3. Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks D. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *The Journal of Experimental Medicine* 16: 1941-1953, 1998.
4. Belkaid Y, Valenzuela J, Kamhawi S, Rowton E, Sacks D, Ribeiro J. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 97: 6704-6709, 2000.
5. Costa D, Favali C, Clarêncio J, Afonso L, Conceição V, Miranda J, Titus R, Valenzuela J, Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infection and Immunity* 72: 1298-1305, 2004.
6. Donnelly K, Lima H, Titus RG. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. *Journal of Parasitology* 84: 97-103, 1998.
7. Ghosh K, Mukhopadhyay J. The effect of anti-sand fly antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. *Int J Parasitol* 28: 275-281, 1998.
8. Gomes R, Brodskyn C, Oliveira C, Costa J, Miranda J, Caldas A, Valenzuela J, Barral-Netto M, Barral A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *The Journal of Infectious Diseases* 186: 1530-1532, 2002.
9. Kamhawi S, Yasmine B, Modi G, Rowton E, Sacks D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290: 1351-1354, 2000.
10. Lerner E, Ribeiro J, Nelson R, Lerner M. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 266: 11234-11236, 1991.
11. Lima H, Titus RG. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 64: 5442-5445, 1996.
12. Mellanby K. Natural history of vertebrate host response to insect bites. *Nature* 158: 554-555, 1946.
13. Ribeiro J. Blood-feeding arthropod: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4: 143-152, 1995.
14. Ribeiro J. Role of arthropod saliva in blood feeding. *Annu Rev Entomol* 32: 463-478, 1987.
15. Sacks D, Perkins P. Identification of an infective stage of leishmania promastigotes. *Science* 1417-1419, 1984.
16. Samuelson J, Lerner E, Tesh R, Titus R. A mouse model of *Leishmania braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *Journal of Experimental Medicine* 173: 49-54, 1991.
17. Silva F, Gomes R, Prates D, Miranda J, Andrade B, Barral-Netto M, Barral A. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *Am J Trop Med Hyg* 72: 94-98, 2005.
18. Stark K, James A. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Biol Chem* 273: 20802-20809, 1998.
19. Titus R, Ribeiro J. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance leishmania infectivity. *Science* 239: 1306-1308, 1988.
20. Valenzuela J. High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1199-1209, 2002.
21. Valenzuela J, Belkaid Y, Garfield M, Mendez S, Kamhawi S, Rowton E, Sacks D, Ribeiro J. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *The Journal of Experimental Medicine* 194: 331-342, 2001.
22. Valenzuela J, Garfield M, Rowton E, Pham V. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *The Journal of Experimental Biology* 207: 3717-3729, 2004.
23. Volf P, Rohousova I. Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology* 122: 37-41, 2001.
24. Vries J, Carballido J, Sornasse T, Yssel H. Antagonizing the differentiation and functions of human T helper type 2 cells. *Curr Opin Immunol* 7: 771-778, 1995.
25. Zer R, Yaroslavski I, Rosen L, Warburg A. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *International Journal for Parasitology* 31: 810-814, 2001.

Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral

Immunopathogenesis of Visceral Leishmaniasis

Olívia Bacellar, Edgar M. Carvalho

Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

A leishmaniose visceral humana é caracterizada por uma diminuição da resposta imune celular ao antígeno de leishmania. Nesses pacientes, o teste de hipersensibilidade tardia para o antígeno de leishmania é negativo e as células mononucleares do sangue periférico não produzem IL-2, IFN- γ e IL-12 quando estimuladas *in vitro*, com antígeno de leishmania. Após o tratamento com cura, essas funções de células T são restauradas. Vários estudos realizados em nosso meio mostraram os principais mecanismos que estão envolvidos na imunopatogênese da leishmaniose visceral. A detecção de indivíduos infectados em uma área endêmica ainda sem a doença permitiu a caracterização da resposta imune a antígenos de leishmania na fase inicial da infecção causada pela *L. chagasi*. Esses resultados mostraram que as alterações imunológicas ocorriam precocemente na infecção e que havia uma associação entre ausência ou baixa proliferação linfocitária e a capacidade reduzida de produzir IFN- γ com a progressão da infecção para a doença. O defeito na proliferação linfocitária e na redução da capacidade de produzir IFN- γ estava relacionada com a produção da IL-10, uma vez que a adição *in vitro* de anticorpo anti-IL-10 teve a capacidade de restaurar tanto a resposta linfoproliferativa quanto a produção de IFN- γ . A adição de IL-12 em culturas de células estimuladas *in vitro* com antígeno aumentou a resposta linfoproliferativa e a produção de IFN- γ nesses pacientes a níveis similares ao observado em pacientes curados da infecção. Todavia, o efeito de IL-12 foi bloqueado pela IL-10 indicando ser esta citocina a principal mediadora das alterações imunológicas observadas na leishmaniose visceral.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, imunopatogênese, IFN- γ , interleucina-10, interleucina-12.

*Visceral leishmaniasis is associated with a marked depression in T cell response, characterized by the absence of IL-2 and IFN- γ production by lymphocytes stimulated by the Leishmania antigen in vitro. Conversely, cure of visceral leishmaniasis is associated with restoration of these T cell functions. Studies carried out in Bahia, Brazil, have established the main mechanisms involved in the immune suppression observed in *L. chagasi* infection. The characterization of the immune response to leishmania antigens in individuals living in an endemic area of *L. chagasi* has shown that these immunological abnormalities occur during early infection and that there is a correlation between the lack of lymphoproliferative response and IFN- γ production and development of the disease. These studies have also shown that in patients with the active disease, the specific lymphocyte proliferation could be restored in vitro by the addition of IL-2 and IFN- γ . Restoration of T cell proliferative responses and IFN- γ production were also observed with the addition of a neutralizing monoclonal antibody α -IL-10. We also evaluated the ability of IL-12, a cytokine that acts on Natural Killer and T cells to produce IFN- γ and restore cellular immune responses in these patients. The addition of IL-12 enhanced the*

Recebido em 22/02/2005

Aceito em 27/05/2005

Endereço para correspondência: Dr. Edgar M. Carvalho, Serviço de Imunologia, 5º andar, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n Canela, 40110-160, Salvador, BA, Brasil. Tel.: 55 71 3237-7353; Fax: 55 71 3245-7110. E-mail: imuno@ufba.br.

proliferative response and IFN- γ production in cultures stimulated with Leishmania antigen, rendering these responses similar to those observed in subjects cured of the disease. However, the exogenous addition of IL-10 abrogated the effect of IL-12. These data suggest that IL-10 is the major cytokine down-modulating the immunological response in visceral leishmaniasis.

Key words: Visceral leishmaniasis, IFN- γ , immunopathogenesis, interleukin-10, interleukin-12.

Aspectos Epidemiológicos e Clínicos

A leishmaniose visceral, também denominada de calazar, é uma doença causada por protozoários intracelulares pertencentes ao gênero *Leishmania*. No novo mundo a doença é causada pela *Leishmania chagasi*. No mediterrâneo, o agente causal é a *Leishmania infantum* e, na África e Ásia, a doença é causada pela *Leishmania donovani*. As leishmanias são transmitidas ao homem através de picada de flebotomíneos, sendo o *Lutzomyia longipalpis* o principal agente transmissor da *Leishmania chagasi*. A leishmaniose visceral americana é uma zoonose que tem como principal reservatório silvestre, no Brasil, a raposa e domiciliar, o cão.

No flebotomo, o parasito tem uma forma flagelada denominada promastigota. Uma vez inoculada no mamífero, a leishmania é fagocitada ou penetra nas células do sistema fagocítico mononuclear, onde perde o flagelo e transforma-se na forma amastigota. Caso essas células não consigam destruir o parasito, este inicia sua multiplicação intracelular, lisando as células infectadas. Os parasitos são, então, liberados, voltando a infectar novas células, repetindo o ciclo de penetração e destruição celular. A propagação da infecção leva a um parasitismo intenso dos órgãos do sistema retículo-endotelial e, conseqüentemente, ao quadro crônico da doença.

A leishmaniose visceral é endêmica em 62 países, com um total de 200 milhões de pessoas em risco, 500.000 casos novos por ano em todo o mundo ⁽²⁸⁾ e com 41.000 mortes registradas no ano 2000 ⁽⁶¹⁾. Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal e Brasil. No Brasil, são notificados cerca de 1.980 casos/ano ⁽³¹⁾ e 90% desses casos ocorrem no Nordeste do país.

Clinicamente, a doença se caracteriza por febre, hepatoesplenomegalia, diarreia, epistaxis, icterícia,

anemia, leucopenia, plaquetopenia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. São complicações graves da doença sangramento no trato digestivo e infecções bacterianas. Essas infecções ocorrem, principalmente, por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e estão associadas à diminuição do número de neutrófilos ⁽²⁾. O tratamento da leishmaniose visceral é feito com antimonial pentavalente que embora altamente eficaz contra *L. chagasi* vem ao longo dos anos perdendo a eficácia contra a *L. donovani* ⁽⁵⁷⁾.

Mecanismos de Defesa contra a Leishmania

Apesar da imunidade celular ser o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra a leishmania, anticorpos e complemento podem destruir a leishmania *in vitro*. As formas promastigotas são fagocitadas pelos neutrófilos, que são as primeiras células a migrarem para o local da infecção ⁽⁶²⁾ e podem ser destruídas através da ação de produtos do metabolismo oxidativo, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), atividade enzimática e produção de óxido nítrico ^(48,50). Os neutrófilos infectados começam a secretar quimiocinas como IL-8 e MIP-1 β ⁽⁵²⁾, moléculas importantes para atrair mais neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção.

A produção de óxido nítrico (NO) como uma via efetora comum de defesa do macrófago contra a leishmania tem sido bem documentada ⁽³⁴⁾. Níveis de óxido nítrico produzidos por macrófagos ativados por interferon-gama (IFN- γ) ou pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) estão relacionados com resistência à infecção, uma vez que macrófagos provenientes de linhagens resistentes de camundongos B10. S., C57Bl/6 e C3H produzem níveis significativamente mais altos de NO do que macrófagos

provenientes de linhagens de camundongos susceptíveis como BALB/c e DBA/2⁽⁴³⁾. Em estudos realizados com *L. donovani*, observou-se que camundongos não possuidores do gene de nitrato sintetase (enzima que catalisa a síntese de NO) não têm capacidade de controlar a infecção⁽⁴⁷⁾.

Em 1986, Mosmann et al.⁽⁴⁵⁾ obtiveram clones de células T CD4⁺ que podiam ser subdivididas em subpopulações baseadas na produção de citocinas após estimulação *in vitro*. As células T “helper” tipo 1 (Th1) produzem IFN- γ e interleucina-2 (IL-2), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), interleucina-3 (IL-3) e linfotóxina (TNF- β), e são responsáveis pela imunidade mediada por células, pelas reações inflamatórias, além de estimular, também, a produção de anticorpos da classe IgG2a. Células T “helper” tipo 2 (Th2) produzem interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13), e mediam a imunidade humoral e as reações alérgicas. A IL-4 está relacionada com a produção de anticorpos da classe IgE, IgG1 e IgG4; e a IL-5 é importante para diferenciação, multiplicação e ativação de eosinófilos⁽⁴⁶⁾. Em modelo experimental, camundongos BALB/c, geneticamente susceptíveis à infecção com *L. major*, possuem alta expressão de RNA mensageiro para IL-4 nas células dos linfonodos que drenam a lesão. Em contraste, camundongos C57BL/6, geneticamente resistentes à infecção por *L. major*, expressam RNA mensageiro para IFN- γ e não para IL-4⁽³⁵⁾.

O controle da infecção por leishmanias é dependente da resposta imune mediada por células. Uma citocina importante na resposta imune à leishmanias é o IFN- γ , produzida principalmente por células T CD4⁺ do tipo Th1, e por células NK, estimuladas por IL-12. Em camundongos resistentes, células TCD4⁺ do tipo Th1 produzem IFN- γ , o que ativa a óxido nítrico sintetase (iNOS ou NOS2), levando ao estímulo da ação microbicida mediada pelo óxido nítrico (NO). A liberação de NO leva à morte do parasita em macrófagos humanos, que podem também ser estimulados pela ação de quimiocinas como MCP-1 e MCP-1 α ^(12,14). Células de animais resistentes C3H/HeN, tratados com uma única dose de anti-IFN- γ

antes da infecção, produzem IL-4 e IL-5 e baixos níveis de IFN- γ , impedindo a eliminação do parasita, apesar de não ocorrer o aparecimento de células Th2. Por outro lado, a co-administração de IFN- γ no período de infecção, em camundongos susceptíveis BALB/c, resulta em aumento da produção de IFN- γ e redução de níveis de IL-4 e IL-5⁽⁵⁵⁾.

A atividade leishmanicida do macrófago está também na dependência da produção do fator de crescimento e transformação β (TGF- β). Essa citocina está relacionada com desativação de macrófago, inibição da ação do IFN- γ e redução da expressão de moléculas MHC classe II⁽²⁹⁾. A infecção *in vitro* de macrófagos de camundongos com *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* leva à produção de TGF- β ⁽¹⁰⁾. O tratamento *in vivo* com TGF- β em animais resistentes à infecção por leishmanias favorece a infecção, mudando o padrão de resposta imune, com o aumento RNA mensageiro para IL-10. Por sua vez, animais susceptíveis, quando tratados com anticorpos monoclonais anti-TGF- β , tornam-se protegidos, apresentando um aumento na expressão de RNAm para IFN- γ nas células dos linfonodos drenantes da lesão^(7,9). Além disso, em camundongos que apresentam uma susceptibilidade intermediária à infecção por *L. major*, o tratamento local com anticorpo anti-TGF- β leva a uma diminuição do número de parasitas e melhora rápida das lesões. O estudo imunohistoquímico nessas lesões mostra que esse tratamento resulta em um aumento da produção de NO, sugerindo que o TGF- β tem um papel importante também na supressão da produção de NO por macrófagos infectados por leishmanias⁽⁴²⁾.

A interleucina-10 (IL-10) é uma outra citocina produzida por macrófagos que contribui para a sobrevivência da leishmanias nessas células. A IL-10 inibe a síntese de citocinas produzidas pelos macrófagos como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α ⁽²⁶⁾ e inibe a função dessas células como apresentadoras de antígeno através da diminuição da expressão de moléculas do MHC classe II⁽²⁷⁾. Um outro efeito importante da IL-10 nos macrófagos é a inibição dos eventos metabólicos associados com sua ativação⁽¹³⁾. Esses efeitos, associados à capacidade dessa citocina de

suprimir a produção de IFN- γ por células T CD4+ tipo Th1, fazem com que a IL-10 interfira na atividade leishmanicida do macrófago. Um outro estudo mostrou que, apesar desses efeitos em camundongos susceptíveis BALB/c infectados com *L. major*, a neutralização da IL-10 com anticorpo anti-IL-10 não altera o desenvolvimento das lesões. Na infecção crônica, quantidades semelhantes de IL-10 são produzidas tanto em linhagens resistentes quanto susceptíveis. Entretanto, no início da infecção, a produção de IL-10 é significativamente maior nos animais susceptíveis⁽²²⁾.

A interleucina-12 (IL-12) tem sido apontada como um dos mais importantes componentes da fase inicial da infecção pela leishmania. A IL-12 é produzida primariamente por células apresentadoras de antígeno (monócitos, macrófagos, células dendríticas e células B) e sua principal atividade biológica é sobre células T e células “natural killer” (NK), nas quais ela estimula a produção de citocinas, principalmente IFN- γ , proliferação celular e citotoxicidade⁽⁶⁰⁾. A IL-12 desempenha um papel importante na diferenciação e expansão de células T CD4+ do tipo Th1 e é importante para o padrão de resistência do camundongo^(53,54). As células NK ativadas por IL-12 são a fonte inicial de IFN- γ na infecção por *L. major* em camundongos resistentes, e a produção de IL-12 encontra-se elevada nas células desses animais⁽⁵³⁾. A neutralização *in vivo* de IL-12 elimina a resposta citotóxica de células NK; e a produção de IFN- γ através de células de linfonodo, por impedir a cura do animal resistente C57BL/6⁽⁵⁸⁾, sugere que a IL-12 endógena é necessária para o controle da infecção, presumivelmente através da indução de IFN- γ , requerida para conter a expansão de amastigotas.

As ações da IL-12 no início da infecção têm incentivado os seus usos no tratamento e profilaxia da leishmaniose. Em animais susceptíveis infectados com *L. major*, a IL-12 associada a uma droga leishmanicida, o antimonial pentavalente, leva a uma mudança de uma resposta Th2 para Th1 e cura da infecção⁽⁴⁹⁾. Em relação à profilaxia, a IL-12 já foi utilizada como adjuvante em vacinação com antígeno de leishmania em camundongos susceptíveis. Após a

vacinação, esses animais desenvolveram uma resposta antígeno-específica Th1 e tornam-se resistentes a uma subsequente infecção com *L. major*⁽¹⁾.

Contribuições da Pesquisa na Bahia na Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral

A principal alteração imunológica na leishmaniose visceral é a incapacidade de linfócitos de ativar macrófagos para destruir a leishmania em virtude da ausência *in vitro* da produção de IFN- γ após estímulo dos linfócitos com antígeno de leishmania⁽¹⁹⁾. Esta incapacidade de produzir IFN- γ é antígeno-específica, pois linfócitos de pacientes com leishmaniose visceral proliferam e produzem essa citocina quando estimulados com antígenos não relacionados como o purificado protéico derivado do *M. tuberculosis* (PPD) e antígeno de *C. albicans*⁽¹⁶⁾. Considerando, entretanto, que a leishmaniose visceral é uma doença debilitante e associada à desnutrição, um importante questionamento era se esta anormalidade imunológica seria realmente importante na progressão da infecção para doença ou se era apenas um achado em pacientes com a forma avançada da infecção por *L. chagasi*. Os estudos realizados em Jacobina/BA na década de 80 tiveram uma grande importância em esclarecer este aspecto. Naquela ocasião, um estudo prospectivo em crianças de 0 a 18 anos foi realizado com o objetivo de determinar, através do teste sorológico ELISA, o número real de crianças infectadas e como essas crianças evoluíam após a infecção. Desta forma, foi detectado que cerca de 75% de indivíduos infectados não evoluíam para a doença, apresentando uma forma assintomática da infecção ou uma infecção subclínica que evoluía para a cura. Um terceiro grupo de crianças apresentavam uma forma subclínica que evoluía para a doença 2 a 10 meses após a soroconversão, e um último grupo apresentou, rapidamente após a infecção por *L. chagasi*, um quadro de leishmaniose visceral⁽⁶⁾. A detecção de indivíduos infectados ainda sem a doença permitiu também a caracterização da resposta imune a antígenos de leishmania antes do aparecimento da leishmaniose visceral. Esses achados demonstraram

nitidamente que as alterações imunológicas eram um achado precoce na infecção e que havia uma associação entre ausência ou baixa proliferação linfocitária e a capacidade reduzida de produzir IFN- γ e a progressão da infecção para a doença ⁽²⁰⁾. A Tabela 1 apresenta a resposta imune em crianças com infecção assintomática, com a forma subclínica, que evoluíram para cura e em crianças, com a forma subclínica, que evoluíram para leishmaniose visceral.

O acompanhamento dessas crianças recém-infectadas permitiu também determinar a cinética do aparecimento da resposta imune celular determinada por testes *in vitro* e *in vivo*. Assim é que enquanto por ocasião da soroconversão cerca de 51% das crianças que tiveram capacidade de controlar a infecção mostraram evidência *in vitro* de resposta imune celular (proliferação linfocitária ou produção de IFN- γ), nenhuma dessas crianças apresentaram teste cutâneo de hipersensibilidade tardia positivo para o antígeno de leishmania. Ao fim de 4 anos de acompanhamento, cerca de 83 % das crianças deixaram de ter anticorpos contra *L. chagasi* e 62% apresentaram teste de hipersensibilidade tardia positivo ⁽²⁰⁾, mostrando que a positividade do teste de hipersensibilidade tardia ocorre após a negatificação da produção de anticorpos.

Embora os pacientes com leishmaniose visceral mostrem uma ativação policlonal de células B com grande produção de anticorpos, esses anticorpos não participam da resistência à leishmaniose. Níveis elevados de complexos imunes circulantes e auto-anticorpos são também observados no calazar ⁽¹⁵⁾. Exceto pela participação secundária que podem ter esses auto-anticorpos no desenvolvimento da anemia e da plaquetopenia observadas no calazar ⁽⁵¹⁾, manifestações clínicas associadas à deposição de complexos imunes não são características da leishmaniose visceral. Por exemplo, é descrito envolvimento renal no calazar, mas não existe uma glomerulonefrite importante nessa doença ⁽³⁰⁾.

As principais disfunções imunológicas na leishmaniose visceral estão relacionadas à imunidade mediada por células. Nestes pacientes, o teste de reação de hipersensibilidade tardia ao antígeno do parasito (Reação de Montenegro) é negativo e a

conversão para uma resposta positiva ocorre após a cura ⁽²⁵⁾. O sobrenadante de células mononucleares, cultivadas com antígeno de leishmania, também não é capaz de ativar macrófagos para destruir leishmania *in vitro*, indicando que linfócitos desses pacientes não produzem citocinas capazes de ativar essas células ⁽¹⁹⁾. Ocorre também, *in vitro*, uma diminuição na produção da IL-1 e de TNF- α por células mononucleares do sangue periférico ⁽³⁶⁾ a despeito da documentação de níveis séricos elevados de TNF- α durante a doença ⁽⁸⁾. Essas alterações imunológicas têm participação importante na patogênese da doença. O IFN- γ é o principal ativador de macrófagos e, somente após ativação, essas células são capazes de destruir a leishmania ⁽⁴⁸⁾. Vários fatores participam da disfunção imunológica observada na leishmaniose visceral. O soro de pacientes com leishmaniose visceral é um potente inibidor da ativação celular e de proliferação linfocitária e a participação de lipídeos e o aumento dos níveis séricos do receptor solúvel de IL-2 participam desta supressão da resposta imune mediada pelo soro ⁽¹¹⁾. Essa supressão mediada por soro foi bem documentada quando doses sub-ótimas de mitógenos foram utilizadas para estimular células mononucleares de indivíduos sadios na presença de soro normal do tipo AB ou soros de pacientes com leishmaniose visceral ⁽¹⁸⁾. Entretanto, a supressão da resposta linfoproliferativa antígeno-específica ocorre mesmo na ausência de soro de pacientes com leishmaniose visceral e é mediada por células ⁽¹⁶⁾. Adicionalmente, tem-se observado alterações na função macrófágica, uma vez que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) desses pacientes, quando estimulados *in vitro* com antígeno de leishmania, não produzem IL-1 ⁽³⁶⁾ e a infecção de macrófagos com esse parasito diminui a expressão de MHC classe II ⁽⁴¹⁾.

Existem indicações *in vitro* da atividade de células líticas contra macrófagos parasitados por leishmania, embora essa lise, não necessariamente, resulte em controle do parasito ⁽⁵⁶⁾. A atividade de células NK tem sido proposta como um importante mecanismo na defesa do hospedeiro contra infecções virais, por fungos e por protozoários ⁽⁵⁹⁾. Estudos *in vitro* com células de crianças com calazar demonstraram uma

Tabela 1. Associação entre resposta imune e desenvolvimento de doença em crianças residentes em uma área endêmica de leishmaniose visceral.

Formas Clínicas	Resposta Imune	
	IFN- γ (UI/mL)	Resposta Linfoproliferativa (Índice de Estimulação)
Assintomáticos	67 $\pm$ 45	38 $\pm$ 48
Subclínicos que não evoluíram para a doença	77 $\pm$ 111	13 $\pm$ 12
Subclínicos que evoluíram para a doença	7 $\pm$ 5	1,8 $\pm$ 1,5

deficiência da atividade de células NK nesses pacientes e a adição de IL-2 foi capaz de corrigir essa deficiência ⁽⁴⁴⁾.

Embora o mecanismo das disfunções imunológicas na leishmaniose visceral não seja completamente esclarecido, admite-se que uma produção exacerbada de citocinas que tenham capacidade de suprimir a resposta imune celular desempenhe um papel importante na ausência da produção de IFN- γ e na sobrevivência da leishmania nos macrófagos. Existem evidências de que, na leishmaniose visceral humana, a ativação de células Th2 pode estar envolvida na progressão da doença. Foram demonstrados níveis altos de IL-4 no soro desses pacientes assim como também de IgE e IgG1 ^(3,63). Em clones de células específicas para o antígeno de leishmania, isolados de pacientes curados de calazar, observou-se, além de uma produção de IFN- γ , uma produção de IL-4 e de IL-10 ^(39,40). A interleucina-10, por ser uma citocina inibidora da resposta imune, principalmente por antagonizar a ação do IFN- γ , um ativador potente dos macrófagos para matar leishmania ⁽⁴⁸⁾, é de grande interesse no estudo da leishmaniose visceral. Em pacientes sudaneses, a expressão de RNA mensageiro para IL-10 em células da medula óssea na fase ativa da doença diminui após a terapêutica ⁽³⁸⁾. Um outro estudo realizado com pacientes infectados com *L. donovani* no Sudão demonstrou a presença de RNA mensageiro para IL-10 tanto em células de linfonodos quanto em células mononucleares desses pacientes. Após o tratamento, não foi possível detectar RNA mensageiro para essa citocina ⁽³²⁾. A participação de células na modulação da resposta imune na leishmaniose visceral foi

inicialmente documentada em experimentos de co-cultura, onde foi mostrado que linfócitos obtidos durante a fase ativa da doença tinham a capacidade de suprimir a proliferação linfocitária de células obtidas após o tratamento e cura da leishmaniose visceral ⁽¹⁶⁾. Posteriormente, em um estudo realizado com pacientes do Ceará infectados com *L. chagasi*, foi demonstrado que linhagens de células T CD8+ isoladas desses pacientes inibiram a resposta proliferativa e a produção de IFN- γ por células desses mesmos pacientes após a terapêutica. Essas alterações foram associadas a um aumento de IL-6 e de IL-10. A adição de anticorpo neutralizante anti-IL-10 também reverteu a diminuição da produção de IFN- γ na presença dessas células ⁽³⁷⁾. Todos esses dados indicam que essa citocina tem um papel importante na patogênese da leishmaniose visceral.

Sendo a principal anomalia na leishmaniose visceral, a incapacidade de desenvolver uma resposta do tipo Th1 e da IL-12 ser a mais importante citocina no desenvolvimento desse tipo de resposta, a ausência dessa citocina pode ser um fator importante nas alterações imunológicas observadas na leishmaniose visceral. Em um estudo realizado no Sudão, foi mostrado que células mononucleares de pacientes com leishmaniose visceral não produzem IL-12 quando estimuladas com antígeno de *L. donovani*, mas, após o tratamento, a produção dessa citocina é observada ⁽³³⁾. Como a IL-12 tem também a capacidade de ativar células NK, este seria um possível mecanismo pelo qual a IL-12 pudesse colaborar na defesa contra a leishmania em adição à indução de uma resposta Th1.

Considerando que o principal achado imunológico na leishmaniose visceral é uma diminuição da produção de IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico, a ausência dessa citocina impede a ativação de macrófagos e a destruição da leishmania. Estudos sobre a restauração *in vitro* da resposta imune não só são importantes para o entendimento da patogênese da doença como também são de grande relevância desde que a resposta imune celular está associada com o controle e a cura da infecção pela leishmania.

Estudos realizados em nosso meio demonstraram que a resposta linfoproliferativa antígeno-específica em pacientes com leishmaniose visceral pode ser restaurada pela adição *in vitro* de IL-2 e IFN- γ ⁽¹⁷⁾. Embora vários fatores possam contribuir para a ausência da resposta imune celular na leishmaniose visceral, as evidências de que existe nesta doença uma ativação de células Th2 e de células regulatórias da resposta imune indicam a importância de avaliar o papel de citocinas com atividade imunomoduladora na patogênese da leishmaniose visceral.

Para determinar o papel dessas citocinas (IL-4, IL-10) na patogênese da leishmaniose visceral, anticorpos neutralizantes anti-IL-4 e anti-IL-10 (citocinas relacionadas com susceptibilidade à doença em modelo experimental e inibidora da resposta imune respectivamente) foram adicionadas à cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas *in vitro* com antígeno solúvel de *L. chagasi* (Figura 1).

Os níveis de IFN- γ em culturas estimuladas com antígeno de *L. chagasi* mais anti-IL-10 (97 ± 77 pg/mL) ou antígeno de *L. chagasi* mais anti-IL-10 e anti-IL-4 (112 ± 101 pg/mL) foram maiores ($p < 0,05$) do que os níveis observados em culturas estimuladas só com o antígeno de *L. chagasi* (13 ± 24 pg/mL) ou antígeno mais IL-4 (21 ± 17 pg/mL) ⁽¹⁷⁾. Esses estudos mostraram que, mais importante do que a resposta Th2 na modulação da resposta imune na leishmaniose visceral, é a produção de IL-10. A adição de IL-4 não teve praticamente nenhum efeito nesta modulação, enquanto a neutralização de IL-10 aumentou significativamente a produção de IFN- γ . Como pacientes curados de leishmaniose visceral restauram *in vitro* a proliferação linfocitária e a síntese de IFN-

γ , o papel de IL-10 na modulação da resposta imune foi também documentada em experimentos nos quais a adição exógena desta citocina foi feita em cultura de células de pacientes curados estimuladas *in vitro* com antígeno de leishmania. A adição de IL-10 suprimiu em 99% a resposta linfoproliferativa e em 100 % a produção de IFN- γ . A adição de TGF- β (outra citocina supressora da resposta imune) nessas culturas não teve nenhum efeito na resposta linfoproliferativa e na produção de IFN- γ nesses pacientes ⁽⁵⁾.

A IL-12 é uma citocina produzida na fase inicial da resposta imune inata e tem papel fundamental na diferenciação de células Th1. A infecção *in vitro* de macrófagos com *L. donovani* mostrou que não só moléculas co-estimulatórias tem sua expressão diminuída como também há diminuição de produção de citocinas por essas células ⁽²⁴⁾. O papel da IL-12 na leishmaniose visceral foi documentado tanto através da adição exógena de IL-12 ou da neutralização desta citocina. Assim é que tanto a adição de IL-12 teve a capacidade de restaurar *in vitro* a proliferação linfocitária e a produção de IFN- γ em pacientes com doença ativa quanto a neutralização de IL-12, utilizando-se anticorpos monoclonais contra essa citocina, bloqueou a produção de IFN- γ em indivíduos curados de calazar ^(4,5).

A importância da IL-12 e da IL-10 na patogênese da leishmaniose visceral é mostrada na Figura 2 ⁽²⁵⁾. A média dos níveis de IFN- γ em culturas de células estimuladas *in vitro* com antígeno de leishmania foi zero e a adição de IL-12 aumentou os níveis dessa citocina para 305 ± 325 pg/mL. A IL-10, além de inibir a atividade de macrófagos, inibe a produção de IFN- γ por linfócitos através da inibição da síntese de IL-12 por células apresentadoras de antígenos ⁽²³⁾. Nestes estudos, enquanto a adição de IL-12 restaurou a resposta proliferativa e a produção de IFN- γ *in vitro*, a adição simultânea de IL-12 e IL-10 suprimiu o efeito mediado por IL-12, diminuindo a produção dessa citocina para zero (Figura 2). Esses resultados indicam que a IL-10 pode suprimir a resposta imune nesses pacientes com leishmaniose visceral através da inibição da síntese de IL-12 ao nível das células apresentadoras de antígeno.

Figura 1. Anticorpo monoclonal anti-IL10 restaura *in vitro* a produção de IFN- γ em pacientes com leishmaniose visceral.

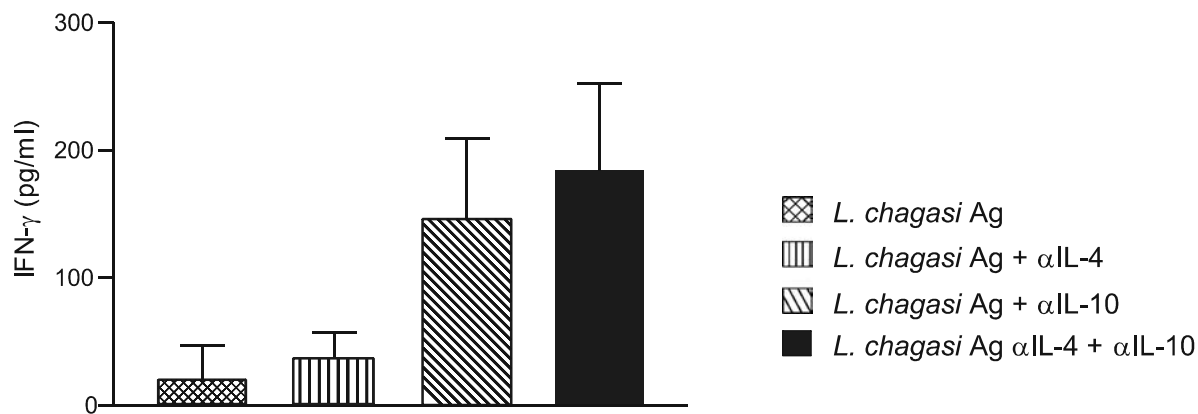
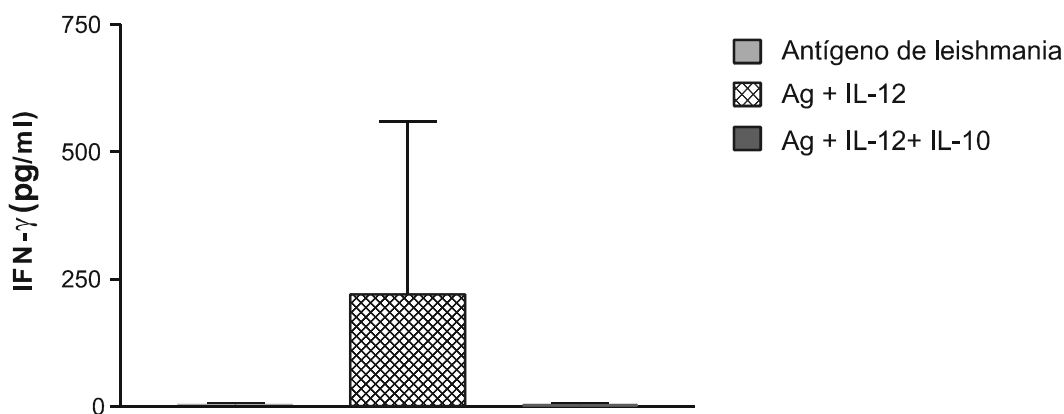


Figura 2. A IL-10 suprime a capacidade da IL-12 de restaurar a resposta imune em pacientes com leishmaniose visceral.



A Importância da Resposta Imune nas Manifestações Clínicas da Leishmaniose Visceral

A resposta imune na infecção causada por *Leishmania chagasi* está intimamente relacionada com o controle ou o desenvolvimento da doença, assim como as manifestações clínicas observadas na leishmaniose visceral. A incapacidade de ativar macrófagos para destruir a leishmania é o principal defeito nessa doença e essa anormalidade se associa com a multiplicação e disseminação do parasita e o

envolvimento de múltiplos órgãos como medula óssea, linfonodos, baço e fígado.

Pacientes com leishmaniose visceral apresentam níveis séricos altos de TNF- α ⁽⁸⁾ e de IL-6 ⁽²¹⁾, que diminuem após a terapêutica com antimonial. Essas citocinas estão relacionadas com febre e astenia e o TNF- α , também conhecido como caquexina, pode contribuir para a perda de peso e acentuar a desnutrição nesses pacientes. Febre e perda de peso são características marcantes da leishmaniose visceral. Emagrecimento, aumento de cílios e edema secundário

a hipoalbuminemia são observados principalmente em crianças.

Existe uma ativação policlonal de linfócitos B com produção exagerada de anticorpos inclusive auto-anticorpos. Essa ativação de linfócitos B leva a um quadro de hiperglobulinemia e à presença de auto-anticorpos e complexos imunes circulantes que poderiam ficar ligados ou adsorvidos às hemácias e conseqüentemente contribuir para a menor sobrevivência das hemácias e a anemia observada na leishmaniose visceral.

Mais recentemente, níveis elevados de TGF- β , biologicamente ativos, também foram documentados no plasma de pacientes com leishmaniose visceral; esses níveis diminuem após a cura da doença. A expressão de TGF- β tem sido também documentada na medula óssea desses pacientes. Apesar de até o momento não existir evidências para um papel do TGF- β como modulador da resposta imune na leishmaniose visceral, sabe-se que essa citocina está associada com a inibição da proliferação celular e pode ter papel importante na redução da produção de hemácias, neutrófilos e plaquetas pela medula óssea e, dessa forma, também contribuir para a patogênese da leishmaniose visceral.

Referências Bibliográficas

1. Afonso LC, Scharon TM, Vieira LQ, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* 263: 235-237, 1994.
2. Andrade TM, Carvalho EM, Rocha H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 162: 1354-1359, 1990.
3. Atta AM, D'Oliveira, Correa J, Atta ML, Almeida RP, Carvalho EM. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59: 426-430, 1998.
4. Bacellar O, Brodsky C, Guerreiro J, Barral-Netto M, Costa CH, Coffman RL, Johnson WD, Carvalho EM. Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 173: 1515-1518, 1996.
5. Bacellar O, D'Oliveira A, Jr., Jeronimo S, Carvalho EM. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine* 12: 1228-1231, 2000.
6. Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson WD, Jr. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 154: 1003-1011, 1986.
7. Barral A, Barral-Netto M, Yong EC, Brownell CE, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proceedings National Academy of Science U S A* 90: 3442-3446, 1993.
8. Barral-Netto M, Badaro R, Barral A, Almeida RP, Santos SB, Badaro F, Pedral-Sampaio D, Carvalho EM, Falcoff E, Falcoff R. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 163: 853-857, 1991.
9. Barral-Netto M, Barral A. Transforming growth factor-beta in tegumentary leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 27: 1-9, 1994.
10. Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 257: 545-548, 1992.
11. Barral-Netto M, Barral A, Santos SB, Carvalho EM, Badaro R, Rocha H, Reed SG, Johnson WD, Jr. Soluble IL-2 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology* 147: 281-284, 1991.
12. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunology Review* 173: 17-26, 2000.
13. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *Journal of Experimental Medicine* 174: 1549-1555, 1991.
14. Brandonisio O, Panaro MA, Fumarola I, Sisto M, Leogrande D, Acquafredda A, Spinelli R, Mitolo V. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in leishmania infantum-infected human macrophages. *Clinical Experimental Medicine* 2: 125-129, 2002.
15. Carvalho EM, Andrews BS, Martinelli R, Dutra M, Rocha H. Circulating immune complexes and rheumatoid factor in schistosomiasis and visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32: 61-68, 1983.
16. Carvalho EM, Bacellar O, Barral A, Badaro R, Johnson WD, Jr. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *Journal of Clinical Investigation* 83: 860-864, 1989.
17. Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology* 152: 5949-5956, 1994.
18. Carvalho EM, Bacellar OA. Lymphocyte reactivity to mitogens in American visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 16: 35-41, 1983.

19. Carvalho EM, Bacellar OA, Reed S, Barral A, Rocha H. Visceral leishmaniasis: a disease associated with inability of lymphocytes to activate macrophages to kill leishmania. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 21: 85-92, 1988.
20. Carvalho EM, Barral A, Pedral-Sampaio D, Barral-Netto M, Badaro R, Rocha H, Johnson WD, Jr. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. *Journal of Infectious Diseases* 165: 535-540, 1992.
21. Cenini P, Berhe N, Hailu A, McGinnes K, Frommel D. Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. *Journal of Infectious Diseases* 168: 986-993, 1993.
22. Chatelain R, Varkila K, Coffman RL. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *Journal of Immunology* 148: 1182-1187, 1992.
23. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *Journal of Experimental Medicine* 178: 1041-1048, 1993.
24. De Almeida MC, Cardoso SA, Barral-Netto M. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. *International Journal of Parasitology* 33: 153-162, 2003.
25. de Andrade T, R.Teixeira, J.A.de Andrade, C.Pereira, and E.M.de Carvalho. Hypersensitivity of delayed type in visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 24: 298-302, 1982.
26. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *Journal of Experimental Medicine* 174: 1209-1220, 1991.
27. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *Journal of Experimental Medicine* 174: 915-924, 1991.
28. Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clinical Dermatology* 14: 417-423, 1996.
29. Ding A, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, Srinivasan S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. *Journal of Immunology* 145: 940-944, 1990.
30. Dutra M, Martinelli R, de Carvalho EM, Rodrigues LE, Brito E, Rocha H. Renal involvement in visceral leishmaniasis. *American Journal Kidney Diseases* 6: 22-27, 1985.
31. Fundação Nacional de Saúde. Guia de Doenças da Fundação Nacional de Saúde. URL: http://www.funasa.gov.br/guia_epi/htm/doencas/leishmaniose_visceral.htm.
32. Ghalib HW, Piuevezam MR, Skeiky YA, Siddig M, Hashim FA, el-Hassan AM, Russo DM, Reed SG. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *Journal of Clinical Investigation* 92: 324-329, 1993.
33. Ghalib HW, Whittle JA, Kubin M, Hashim FA, el-Hassan AM, Grabstein KH, Trinchieri G, Reed SG. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. *Journal of Immunology* 154: 4623-4629, 1995.
34. Green SJ, Nacy CA, Meltzer MS. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to leishmania and other intracellular pathogens. *Journal of Leukocyte Biology* 50: 93-103, 1991.
35. Heinzel FP, Sadick MD, Mutha SS, Locksley RM. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proceedings National Academy Science USA* 88: 7011-7015, 1991.
36. Ho JL, Badaro R, Schwartz A, Dinarello CA, Gelfand JA, Sobel J, Barral A, Netto MB, Carvalho EM, Reed SG, et al. Diminished *in vitro* production of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha during acute visceral leishmaniasis and recovery after therapy. *Journal of Infectious Diseases* 165: 1094-1102, 1992.
37. Holaday BJ, Pompeu MM, Jeronimo S, Texeira MJ, Sousa Ade A, Vasconcelos AW, Pearson RD, Abrams JS, Locksley RM. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala azar. *Journal of Clinical Investigation* 92: 2626-2632, 1993.
38. Karp CL, el-Safi SH, Wynn TA, Satti MM, Kordofani AM, Hashim FA, Hag-Ali M, Neva FA, Nutman TB, Sacks DL. *In vivo* cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *Journal of Clinical Investigation* 91: 1644-1648, 1993.
39. Kemp K, Kemp M, Kharazmi A, Ismail A, Kurtzhals JA, Hviid L, Theander TG. leishmania-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. *Clinical Experimental Immunology* 116: 500-504, 1999.
40. Kemp M, Kurtzhals JA, Bendtsen K, Poulsen LK, Hansen MB, Koeck DK, Kharazmi A, Theander TG. *Leishmania donovani*-reactive Th1- and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity* 61: 1069-1073, 1993.

41. Kwan WC, McMaster WR, Wong N, Reiner NE. Inhibition of expression of major histocompatibility complex class II molecules in macrophages infected with *Leishmania donovani* occurs at the level of gene transcription via a cyclic AMP-independent mechanism. *Infection and Immunity* 60: 2115-2120, 1992.
42. Li J, Hunter CA, Farrell JP. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. *Journal of Immunology* 162: 974-979, 1999.
43. Liew FY, Li Y, Moss D, Parkinson C, Rogers MV, Moncada S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *European Journal of Immunology* 21: 3009-3014, 1991.
44. Manna PP, Bharadwaj D, Bhattacharya S, Chakrabarti G, Basu D, Mallik KK, Bandyopadhyay S. Impairment of natural killer cell activity in Indian kala-azar: restoration of activity by interleukin 2 but not by alpha or gamma interferon. *Infection and Immunity* 61: 3565-3569, 1993.
45. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* 136: 2348-2357, 1986.
46. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology* 7: 145-173, 1989.
47. Murray HW, Nathan CF. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *Journal of Experimental Medicine* 189: 741-746, 1999.
48. Murray HW, Rubin BY, Rothermel CD. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *Journal of Clinical Investigation* 72: 1506-1510, 1983.
49. Nabors GS, Afonso LC, Farrell JP, Scott P. Switch from a type 2 to a type 1 T helper cell response and cure of established *Leishmania major* infection in mice is induced by combined therapy with interleukin 12 and Pentostam. *Proceedings National Academy Science U S A* 92: 3142-3146, 1995.
50. Pearson RD, Steigbigel RT. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Immunology* 127: 1438-1443, 1981.
51. Pontes De Carvalho LC, Badaro R, Carvalho EM, Lannes-Vieira J, Vinhaes L, Orge G, Marsochi MC, Galvao-Castro B. Nature and incidence of erythrocyte-bound IgG and some aspects of the physiopathogenesis of anaemia in American visceral leishmaniasis. *Clinical Experimental Immunology* 64: 495-502, 1986.
52. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunology Review* 177: 195-203, 2000.
53. Scharton TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *Journal Experimental Medicine* 178: 567-577, 1993.
54. Scharton-Kersten T, Afonso LC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *Journal of Immunology* 154: 5320-5330, 1995.
55. Scott P, Kaufmann SH. The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunology Today* 12: 346-348, 1991.
56. Smith LE, Rodrigues M, Russell DG. The interaction between CD8+ cytotoxic T cells and leishmania-infected macrophages. *Journal Experimental Medicine* 174: 499-505, 1991.
57. Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, Kumar PC, Murray HW. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clinical Infectious Diseases* 31: 1104-1107, 2000.
58. Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF, Schaub RG. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *Journal Experimental Medicine* 177: 1797-1802, 1993.
59. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Advances Immunology* 47: 187-376, 1989.
60. Trinchieri G, Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. *Journal of Leukocyte Biology* 59: 505-511, 1996.
61. WHO. The world health report 2001. Geneva: WHO.
62. Woodman RC, Johnston B, Hickey MJ, Teoh D, Reinhardt P, Poon BY, Kubes P. The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice. *Journal Experimental Medicine* 188: 2181-2186, 1998.
63. Zwingenberger K, Harms G, Pedrosa C, Omena S, Sandkamp B, Neifer S. Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon-gamma production. *Clinical Immunology Immunopathology* 57: 242-249, 1990.

O Modelo Experimental nas Infecções Causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

Experimental Models of Infections Caused by *L. amazonensis* and *L. braziliensis*

Camila I. de Oliveira¹, Manoel Barral-Netto^{1,2,3}

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ; Faculdade de Medicina da Bahia, UFBA; Instituto de Investigação em Imunologia; Salvador, BA, Brasil

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, os quais são transmitidos para o hospedeiro vertebrado por insetos flebotomíneos. Diferentes espécies de *Leishmania* podem causar distintas manifestações clínicas da doença e o curso da infecção também sofre influência da composição genética do hospedeiro. Muito do que sabemos sobre a resposta do indivíduo à infecção por *Leishmania* vem do estudo com camundongos. Algumas linhagens de camundongos são resistentes à infecção enquanto outras são extremamente suscetíveis, permitindo estudar os mecanismos imunes que regulam a resposta ao parasita. A seguir, serão revisados os modelos experimentais utilizados no estudo das leishmanioses causadas por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major*, leishmanioses, BALB/c.

Leishmaniasis are a group of diseases caused by parasitic protozoa of the genus Leishmania, which are transmitted to the vertebrate host by phlebotomine insects. Different Leishmania species may induce distinct clinical manifestations of the disease, and infection outcome is also influenced by the host's genetic background. Most of the knowledge on individual response comes from studies conducted in mice. Some mice strains are susceptible to infection, whereas others are extremely resistant, a fact that allows the study of the underlying mechanisms regulating the immune response to infection. In this review, we comment on the experimental models of infection currently used to study leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis and L. amazonensis.

Key words: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major*, leishmaniasis, BALB/c.

As leishmanioses são um conjunto de doenças cujo agente etiológico é a *Leishmania*, transmitido por insetos flebotomíneos. O espectro clínico desse conjunto de doenças inclui a leishmaniose tegumentar,

desde a leishmaniose cutâneo-localizada até a leishmaniose cutâneo-difusa, e a leishmaniose visceral, desde a forma subclínica até a doença fatal. Nas Américas, os parasitas que causam a leishmaniose tegumentar pertencem aos complexos *Leishmania braziliensis* (subgênero *Viannia*) e *Leishmania mexicana* (subgênero *Leishmania*), enquanto o agente etiológico da leishmaniose visceral é a *Leishmania chagasi* (subgênero *Leishmania*). Os modelos experimentais de infecção constituem uma importante ferramenta para o estudo das leishmanioses, tanto no que diz respeito à patogênese, quanto no que diz respeito ao desenvolvimento de vacinas.

Recebido em 22/02/2005

Aceito em 27/05/2005

Endereço para correspondência: Dr. Manoel Barral-Netto, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, BA, Brasil, 40296-710. Tel (+55) 71 3356 8782 r. 215, FAX (+55) 71 3356 8782 r. 261. Endereço eletrônico: mbarral@cpqgm.fiocruz.br

Gazeta Médica da Bahia 2005;75(1):Jan-Jun:35-45.

© 2005 Gazeta Médica da Bahia (ISSN 0016-545X).

Todos os direitos reservados.

O Modelo Experimental Clássico: *L. major*

Com relação à leishmaniose tegumentar (LT), o modelo experimental mais bem estudado até hoje é o de infecção de camundongos com *Leishmania major*, uma das espécies responsáveis pela LT no Oriente Médio^(27,43). Nesse modelo de infecção dito convencional, altas doses do parasita (10^5 - 10^7), em fase estacionária, são inoculadas na pata do animal; a manifestação clínica subsequente está diretamente relacionada à linhagem do camundongo utilizada. Assim, camundongos das linhagens C3H/He, 129Sv/Ev, CBA e C57BL/6 são ditos resistentes à infecção, pois desenvolvem pequenas lesões que curam espontaneamente em 10-12 semanas. Após a cura espontânea, os animais também se tornam resistentes a uma nova inoculação de parasitas. Por outro lado, camundongos da linhagem BALB/c são altamente suscetíveis à infecção por *L. major*: eles desenvolvem extensas lesões na pele que se expandem e levam à morte do animal. A resistência ou susceptibilidade das diferentes linhagens de camundongos à infecção por *L. major* está fortemente associada ao padrão de resposta imune celular, mais especificamente ao perfil de citocinas Th1 ou Th2 produzido em resposta à infecção. Em camundongos suscetíveis, observa-se alta produção de IL-4. Esse padrão de resposta do tipo Th2 leva à desativação de macrófagos e à permanência do parasita. Em animais resistentes, observa-se um padrão de resposta do tipo Th1 com alta produção de IFN- γ , ativação de macrófagos e, conseqüentemente, eliminação do parasita. Sabe-se também que a produção de reativos de oxigênio e de nitrogênio, por macrófagos ativados por IFN- γ , é inibida na presença de citocinas como TGF- β , IL-4, IL-13 e IL-10, indicando que a diminuição na produção de citocinas do tipo Th2 pode ser importante para o desenvolvimento de uma resposta imune adquirida⁽¹⁹⁾. Sendo assim, o desenvolvimento de susceptibilidade ou resistência à infecção por *L. major* depende de múltiplos fatores, e a utilização de linhagens de camundongos geneticamente diferentes permite o estudo do espectro clínico da LT.

O Modelo Experimental de Infecção Subcutânea Aplicado à *L. braziliensis* e à *L. amazonensis*

No Brasil, as principais espécies causadoras da LT são *L. braziliensis* e *L. amazonensis*⁽¹⁷⁾. Modelos experimentais que envolvem a infecção subcutânea com esses dois parasitas já foram desenvolvidos. Com respeito à *L. braziliensis*, no entanto, os estudos são mais escassos, uma vez que esse parasita não é facilmente cultivável *in vitro* e a obtenção de promastigotas metacíclicos (o estágio infectivo do parasita), em condições de cultura, é ineficiente. Conseqüentemente, um grande número de parasitas (10^7) deve ser utilizado nos inóculos a fim de que se obtenha infecção⁽³⁴⁾. Contudo, Childs et al.⁽²¹⁾ mostraram que a maioria das linhagens de camundongos é resistente à infecção: as linhagens C3H/HeJ, C57BL/6 e CBA/CaJ não mostraram qualquer evidência de infecção enquanto as linhagens AKR/J e CBA/J apresentaram apenas um pequeno e transiente edema quando os parasitas foram injetados no focinho dos animais. Por outro lado, as linhagens SWR/J, C57L/J, A/J, A/HeJ e DBA/1J desenvolveram pequenos nódulos após a infecção, que se curaram espontaneamente. Os camundongos BALB/c foram classificados como os mais suscetíveis à infecção, embora a *L. braziliensis* não cause, nessa linhagem, lesões severas ou de longa duração⁽²¹⁾. A análise da resposta imune de camundongos infectados com *L. braziliensis* mostrou uma forte produção de IFN- γ , enquanto camundongos infectados com *L. braziliensis* e posteriormente tratados com anti-IFN- γ , apresentam um aumento significativo no tamanho na lesão e não conseguem resolver a infecção⁽²⁴⁾. Os autores sugerem, então, que um mecanismo dependente de IFN- γ é responsável pela eliminação da *L. braziliensis* em camundongos BALB/c e, por outro lado, a pouca infectividade desse parasita está associada à sua inabilidade em induzir à produção longa e continuada de IL-4. No entanto, foi demonstrado que biópsias de pele de pacientes com LT causada por *L. braziliensis* apresentam IFN- γ , TNF- α ⁽³⁷⁾ e iNOS⁽²⁰⁾. Por outro lado, nosso grupo mostrou que a adição de TGF- β a culturas de macrófagos

murinos leva a um aumento na replicação de *L. braziliensis*, enquanto a adição de anticorpos anti-TGF- β diminui os níveis de infecção⁽⁷⁾. A exacerbação da infecção por *L. braziliensis* foi associada a um aumento na expressão de IL-10 em linfonodos regionais. Esses resultados demonstram que o TGF- β é capaz de alterar o curso da infecção por *L. braziliensis*. Assim, diversas moléculas desempenham um importante papel no controle da carga parasitária e, em paralelo, contribuem para o desenvolvimento de um processo inflamatório intenso no local de inoculação do parasita. Conclui-se que a infecção de camundongos ou mesmo do homem por *L. braziliensis* não é um processo silencioso, e que o balanço na produção de citocinas é crucial para que a infecção siga para o curso da cura espontânea.

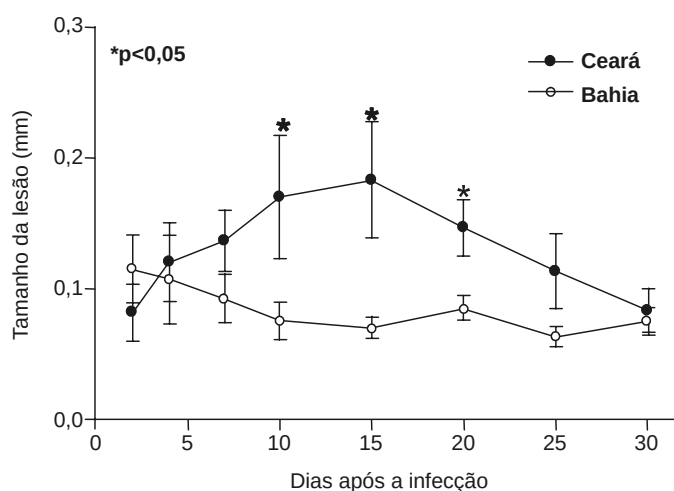
Em contraposição, foi mostrado que o parasita também desempenha um papel importante na dicotomia entre desenvolvimento da doença ou parasitismo assintomático. Isolados de *L. major*, obtidos no campo, apresentam diferenças na patogenicidade após a inoculação em camundongos BALB/c⁽³¹⁾. Estudos realizados com *L. mexicana* demonstraram a correlação entre características genotípicas de isolados e uma determinada manifestação clínica da doença⁽¹⁶⁾. Dessa maneira, a diversidade genética do parasita também é um fator importante no que diz respeito às características clínicas da leishmaniose.

A lesão cutânea de pacientes com LT do Ceará é acompanhada e, às vezes, é até precedida de uma linfadenopatia regional bastante pronunciada. Nesses casos, cunhou-se o termo leishmaniose bubônica para a descrição desse tipo de manifestação clínica⁽⁴⁶⁾. A leishmaniose bubônica é restrita ao Ceará e às infecções com *L. braziliensis*. Entretanto, estudos prévios de nosso grupo demonstraram a ocorrência de linfadenopatia regional também em infecções por *L. braziliensis* na Bahia^(6,8,46). Utilizando o modelo experimental de infecção na pata, nosso grupo investigou se essas diferenças na manifestação clínica da LT estariam associadas a características intrínsecas dos parasitas. Para tal, utilizamos uma cepa de *L. braziliensis* do Ceará e outra da Bahia⁽²⁸⁾. Em ensaios

de RAPD, a cepa de *L. braziliensis* da Bahia apresentou um padrão de amplificação distinto daquele apresentado pela cepa de *L. braziliensis* do Ceará. Em seguida, infectamos camundongos BALB/c na pata, com essas duas linhagens e observamos que os animais infectados com a cepa do Ceará desenvolvem lesões, enquanto os animais infectados com uma cepa proveniente da Bahia não o fazem (Figura 1). Ao examinarmos a resposta imune desenvolvida por esses dois grupos de animais, observamos que, inicialmente, os animais inoculados com a cepa da Bahia apresentam maior produção de IFN- γ , o que foi correlacionado com a ausência de lesão; enquanto os animais inoculados com a cepa do Ceará apresentam maior produção de IL-4, o que foi correlacionado com a presença de lesão. Mais tarde, os animais inoculados com a cepa do Ceará também passam a produzir IFN- γ e, assim, apresentam a cura espontânea da lesão desenvolvida.

Em seguida, nosso grupo investigou o padrão inflamatório desenvolvido por camundongos BALB/c infectados com essas mesmas duas cepas de *L. braziliensis* (Bahia x Ceará)⁽⁴⁷⁾. Observamos que a cepa de *L. braziliensis* do Ceará induz a um maior recrutamento de células (neutrófilos e macrófagos) para o local da inoculação do parasita. Esse recrutamento celular pôde ser correlacionado com a expressão das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP1-a e CXCL1/KC. Por outro lado, a cepa de *L. braziliensis* da Bahia induz a uma maior expressão de CXCL10/IP10. Novamente, esses achados apresentam uma correlação *in vivo*: lesões de pacientes de LT apresentam um aumento na expressão de CCL2/MCP-1 e CCL3/MIP1-a⁽⁴²⁾, e macrófagos humanos e murinos infectados com *Leishmania* também expressam CCL2/MCP-1 e CXCL1/KC^(4,40). A expressão dessas quimiocinas na pata de camundongos infectados com a cepa de *L. braziliensis* do Ceará pode explicar o maior recrutamento de macrófagos e monócitos para o local da inoculação do parasita. Esses achados mostram, então, que as quimiocinas, assim como seus receptores, são fatores que regulam a resposta inflamatória decorrente da infecção com uma ou outra cepa de *L. braziliensis*.

Figura 1. Curso do desenvolvimento da lesão de camundongos BALB/c inoculados com cepas de *L. braziliensis*. Os camundongos foram infectados, na pata, com 10^6 promastigotas de uma cepa do Ceará (●) ou de uma cepa da Bahia (○), e o tamanho da lesão foi medido por trinta dias. Os dados apresentados reportam a média $\pm$ o erro padrão da média de três experimentos independentes, cada um com cinco animais. O asterisco indica diferença significativa entre os valores, como determinado pelo teste T de Student (* $p < 0,05$).



Conjuntamente, esses trabalhos mostram que cepas de *L. braziliensis* de duas regiões geográficas do Brasil apresentam um comportamento biológico distinto quando inoculadas na pata de camundongos BALB/c no que diz respeito à formação de uma lesão cutânea e ao desenvolvimento de uma resposta imune celular. Além disso, essas diferenças puderam ser correlacionadas com a “identidade genética” dos parasitas, como evidenciado por ensaios de RAPD.

Sendo assim, observa-se que a espécie do parasita desempenha um papel importante na determinação do padrão de resposta imune. Estudos realizados na Bahia vêm demonstrando essa importância. Camundongos CBA/J são resistentes à infecção por *L. major* e essa resistência é caracterizada pela produção de IFN- γ , pela ausência de IL-4 e pela presença de um infiltrado inflamatório composto por linfócitos, macrófagos e pela formação de granulomas⁽³³⁾. Por outro lado, camundongos CBA/J infectados com *L. amazonensis* são altamente suscetíveis à infecção, pois produzem IL-4 e IL-10, mas não produzem IFN- γ . A análise histopatológica das lesões desenvolvidas mostra a presença de um infiltrado mononuclear difuso, com

inúmeros macrófagos parasitados e raros linfócitos, semelhante ao observado em camundongos BALB/c infectados com *L. major*. A partir desses resultados, tornou-se interessante investigar os eventos iniciais da infecção com ambas as espécies de parasita. Observou-se que macrófagos de camundongos CBA/J tratados com IFN- γ apresentam infecção reduzida por *L. major* quando comparados com macrófagos infectados com *L. amazonensis*; e essa redução na infecção por *L. major* foi associada à produção de TNF- α ⁽²⁶⁾. Em paralelo, ocorre inibição da produção de óxido nítrico induzida por LPS em macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis*, o que foi correlacionado com uma diminuição na atividade de iNOS sintetase⁽⁵⁾. Assim, concluiu-se que a *L. amazonensis* é capaz de inativar e de resistir tanto aos mecanismos inatos de resposta quanto àqueles induzidos por IFN- γ . Assim, a espécie do parasita e a sua interação com macrófagos determinam a polarização da resposta imune para susceptibilidade ou resistência. Na verdade, a infecção com *L. amazonensis* causa lesões cutâneas progressivas na maioria das linhagens isogênicas de camundongos.

Acredita-se que a ativação deficiente dos mecanismos imunes contribui para a patogênese da doença. Nesse sentido, observou-se que camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* apresentam uma demora significativa na expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFN- γ e na expressão de quimiocinas e de seus receptores ⁽²⁹⁾. Esses achados foram correlacionados a uma resposta celular deficiente frente ao estímulo com parasita *in vivo* e *in vitro*. Assim, sugere-se que os mecanismos imunes atuantes nos eventos iniciais da infecção por *L. amazonensis* estão bloqueados.

Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que a *L. amazonensis* é um agente importante da LT na Bahia e esta infecção produz um amplo espectro clínico de doenças: as manifestações clínicas variam desde a forma cutânea localizada até a forma visceral ⁽⁹⁾. Empregando o modelo experimental murino, mostramos que um mesmo clone de *L. amazonensis* promove cursos diferentes de infecção ⁽¹⁰⁾. Os níveis de anticorpos anti-leishmania foram mais altos em camundongos BALB/c, mas somente os camundongos C57BL/6 apresentaram um resultado positivo no teste de hipersensibilidade tardia, tanto no começo quanto no final de infecção. Assim, camundongos BALB/c são suscetíveis à infecção enquanto camundongos C57BL/6 são resistentes. De maneira complementar, avaliamos o curso da infecção causada no mesmo animal (BALB/c) por diferentes cepas de *L. amazonensis*, obtidas de pacientes com diferentes manifestações clínicas da doença ⁽²⁾. Camundongos infectados na pata com cepas obtidas de pacientes com leishmaniose cutânea ou mucocutânea desenvolvem lesões ulceradas, com a presença de macrófagos parasitados e extensiva destruição tecidual. No entanto, camundongos infectados com cepas obtidas de pacientes com leishmaniose visceral apresentaram infecção controlada, com pequenas lesões e formação de granuloma. Esses estudos reforçam o papel do parasita e as possíveis variações intra-espécie no desenvolvimento da doença.

No intuito de investigar as características que poderiam explicar o curso diferente da infecção por *L. amazonensis*, analisamos aspectos da interação parasita-hospedeiro. Demonstramos que a *L. amazonensis* causa cursos diferentes de infecção em camundongos selecionados para alta ou baixa produção de anticorpos e camundongos selecionados para baixa ou alta resposta a mitógenos ⁽²⁵⁾. Camundongos com alta produção de anticorpos desenvolvem lesões grandes e capazes de se disseminar, enquanto camundongos com alta resposta a mitógenos apresentam fenótipo de resistência.

Em seguida, estudamos os mecanismos de destruição da *L. amazonensis* em camundongos BALB/c imunizados com antígeno solúvel de *Leishmania* ⁽³⁹⁾. Esta linhagem, normalmente suscetível à infecção, torna-se parcialmente resistente após a inoculação intravenosa do antígeno solúvel. Nos animais imunizados, foram observados também parasitas mortos pela lise de macrófagos infectados. Ainda nos camundongos BALB/c imunizados com antígeno solúvel de *L. amazonensis*, avaliamos os mecanismos de ativação de linfócitos T ⁽³⁸⁾.

Empregando o modelo experimental de infecção por *L. amazonensis*, estudamos a influência da infecção pelo vírus LP-BM5 (vírus da leucemia murina) sobre o desenvolvimento da leishmaniose. Camundongos C57BL/6 (naturalmente resistentes ao parasita) infectados com *L. amazonensis* e, posteriormente, infectados pelo vírus apresentam lesões maiores e com padrão histológico semelhante ao apresentado por camundongos BALB/c (naturalmente suscetíveis ao parasita) ⁽¹¹⁾. No entanto, quando os camundongos são primeiramente infectados pelo vírus e, em seguida, com *L. amazonensis*, a lesão não se desenvolve. Quando avaliamos o padrão histológico, observamos, nesses animais, macrófagos densamente parasitados e poucos linfócitos. Concluímos que a infecção pelo vírus influenciou o recrutamento celular para o local da infecção pelo parasita.

Utilizando o modelo experimental de *L. amazonensis*, demonstramos também o efeito

protetor *in vivo* de uma lectina obtida de *Canavalia braziliensis* em camundongos BALB/c⁽¹²⁾. Observamos que essa lectina foi capaz de reduzir as lesões derivadas da infecção pelo parasita e observamos também que este mecanismo não era mediado por IFN- γ , uma vez que a neutralização com anticorpos anti-IFN- γ não alterou a proteção conferida pela lectina.

O Modelo Experimental de Infecção Intradérmica

A transmissão da *Leishmania* ocorre quando o inseto vetor (flebotomo) realiza o repasto sangüíneo no hospedeiro vertebrado e, nesse momento, injeta os parasitas (1-1.000 promastigotas) juntamente com sua saliva. Na tentativa de reproduzir a biologia da transmissão da *Leishmania*, Belkaid et al.⁽¹³⁾ desenvolveram um modelo intradérmico de infecção com *L. major*. Nesse modelo, pequenas doses do parasita (1.000) são inoculadas na derme da orelha de camundongos, empregando-se uma seringa de insulina. O racional por trás da inoculação do parasita na derme do camundongo reside no fato de que esse é o local onde a infecção ocorre naturalmente. Além disso, a pele possui células e estruturas especializadas e mais bem adaptadas para responder aos ataques por microorganismos. Nesse modelo de infecção intradérmica, os padrões de susceptibilidade e resistência de camundongos BALB/c e C57BL/6, respectivamente, foram mantidos. No entanto, quando os parasitas são inoculados na presença da saliva do vetor, como acontece na natureza, ocorre uma exacerbação dramática da infecção. Assim, tanto os camundongos BALB/c quanto os C57BL/6 apresentaram lesões maiores quando inoculados com parasita mais saliva do vetor, se comparadas às lesões desenvolvidas pelos animais inoculados com parasitas somente. De fato, os camundongos C57BL/6 inoculados com parasita mais saliva não foram capazes de curar as lesões dérmicas, diferentemente do que aconteceu

quando a mesma infecção foi feita na pata, pela via subcutânea⁽⁴⁹⁾. Sendo assim, concluiu-se que a resposta imune decorrente da infecção com parasita mais saliva varia conforme a via de inoculação (intradérmica x subcutânea).

O Modelo Experimental de Infecção Intradérmica Aplicado à *L. braziliensis* e à *L. amazonensis*

Diante dos achados descritos acima, nosso grupo interessou-se em desenvolver um modelo experimental semelhante, empregando *L. braziliensis*⁽²³⁾. Nossos resultados mostraram que camundongos BALB/c infectados com 10⁵ parasitas na derme da orelha desenvolvem uma lesão cutânea no local da inoculação (Figura 2), e essa lesão é semelhante àquela observada em pacientes com LT: localizada, ulcerada, com bordas elevadas e fundo necrótico^(30,35). Ao realizarmos a análise histopatológica da lesão, observamos que o infiltrado inflamatório consistia de células polimorfonucleares e de inúmeros macrófagos parasitados. Nove semanas após a infecção, momento em que se observa o início do processo de cicatrização, o infiltrado inflamatório consistia de escassos macrófagos parasitados, células epitelióides, poucos linfócitos e plasmócitos (Figura 3). Ao examinarmos a carga parasitária, observamos que, no sítio de inoculação, o aumento e a diminuição dessa carga ocorrem paralelamente ao aparecimento e à cura da lesão. Entretanto, no linfonodo drenante da lesão, a carga parasitária permanece constante, não havendo diminuição no número de parasitas, mesmo após a cura da lesão.

Como descrito anteriormente, camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*, por via subcutânea ou por via intradérmica, apresentam cura espontânea da lesão. Essa cura está associada à potente resposta imune celular do tipo Th1 induzida. De fato, ao examinarmos as citocinas produzidas pelos animais infectados, observamos, por citometria de fluxo, uma forte produção de IFN- γ , tanto por células T CD4+ quanto por células T CD8+. Utilizando o modelo de infecção subcutânea, foi demonstrado que células T

Figura 2. A inoculação de *L. braziliensis* na derme da orelha de camundongos BALB/c leva ao desenvolvimento de uma lesão ulcerada. (A) Camundongos BALB/c foram infectados com 10^5 promastigotas, e o curso do desenvolvimento da lesão foi monitorado por dez semanas. Os dados apresentados reportam a média $\pm$ o erro padrão da média de três experimentos independentes, cada um com cinco animais. (B) Fotomicrografia da orelha de camundongo após cinco semanas de infecção, demonstrando a lesão ulcerada com bordas elevadas e fundo necrótico.

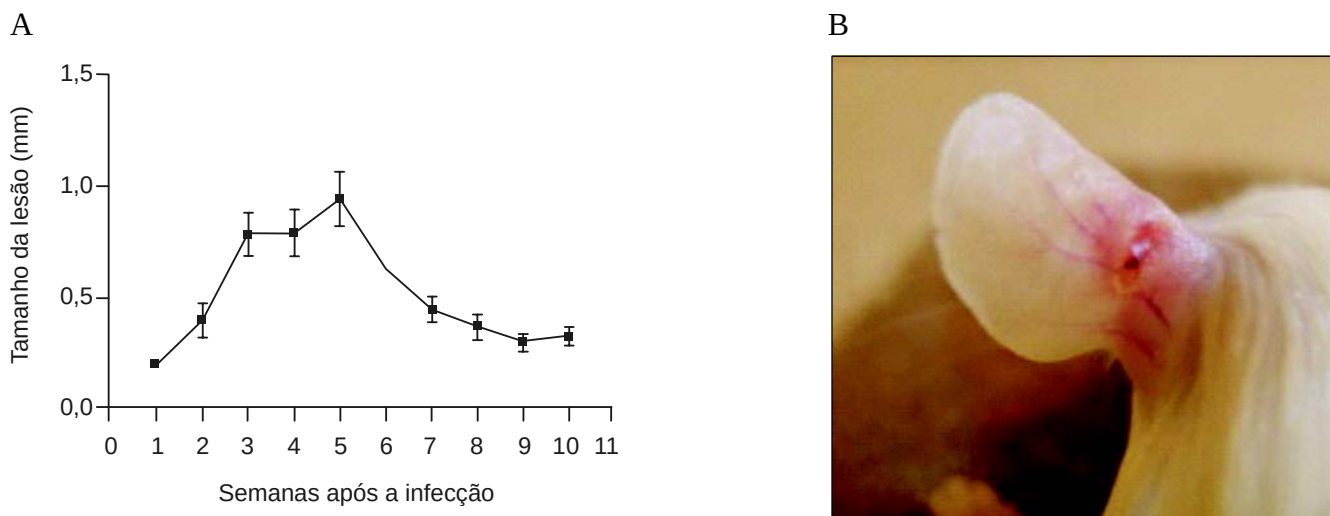
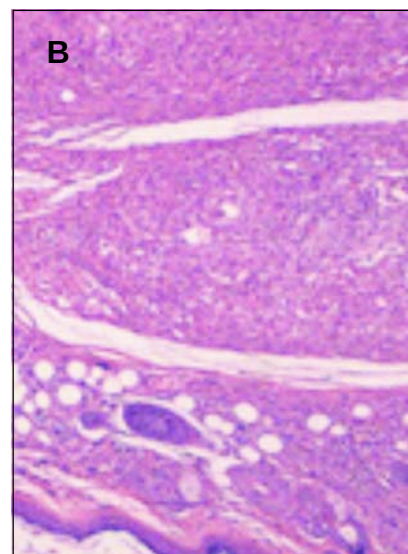
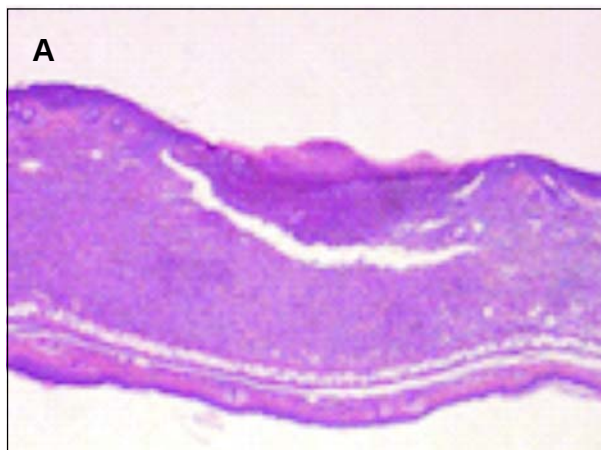


Figura 3. Aspectos histológicos das lesões da orelha em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* pela via intradérmica de *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c (cinco por grupo) foram infectados com 10^5 promastigotas. As orelhas foram removidas 5 (A) e 9 semanas (B) após a infecção e foram coradas com hematoxilina e eosina. (A) Lesão ulcerada mostrando necrose fibrinóide extensa e infiltrado inflamatório. Magnificação x 40. (B) A reconstituição da epiderme acompanha o processo de cicatrização. Presença de infiltrado inflamatório composto por poucos parasites, células epitelióides, plasmócitos e deposição de colágeno. Magnificação x 100.



CD8+, específicas para *Leishmania*, são encontradas em maior número em animais resistentes⁽⁵⁰⁾. O papel das células T CD8+ foi recentemente reexaminado no contexto da infecção com *L. major* pela via intradérmica, e foi possível demonstrar seu acúmulo na pele e sua capacidade de produzir IFN- γ em resposta ao estímulo com parasitas⁽¹⁵⁾. Em nosso trabalho com *L. braziliensis*, observamos que os parasitas permanecem no linfonodo drenante, apesar do desenvolvimento de uma resposta imune celular capaz de eliminar a lesão. Vale ressaltar que resultados similares foram encontrados nos ensaios de infecção com *L. braziliensis* pela via subcutânea (M.J. Teixeira, resultados não publicados). Esses achados sugerem que o parasita é capaz de “escapar” da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro, ou este desenvolve imunossupressão e, conseqüentemente, assegura a permanência do parasita. Já foi demonstrado que tanto o homem quanto camundongos são capazes de manter parasitas no tecido linfóide após a cura espontânea ou após o tratamento^(1,41,45). No modelo de infecção com *L. major* pela via subcutânea, a persistência dos parasitas foi associada aos fibroblastos do linfonodo, que, comparados aos macrófagos, apresentam uma capacidade reduzida de eliminar a *Leishmania* intracelular. Os fibroblastos atuam como um “porto seguro”, albergando o parasita durante a infecção crônica⁽¹⁸⁾. Por outro lado, a participação de células T regulatórias também foi associada à persistência de *L. major* em camundongos resistentes^(14,36). As células T regulatórias suprimem a ação das células T efectoras por meio da produção de citocinas como IL-10 e TGF- β ⁽⁴⁴⁾. Na infecção por *Leishmania*, a presença de células T regulatórias pode controlar a patogênese a partir da presença de citocinas antiinflamatórias e, ao mesmo tempo, pode assegurar a imunidade contra a reinfecção pela constante estimulação antigênica. Nesse sentido, observamos que camundongos infectados com *L. braziliensis* pela via intradérmica são resistentes a um desafio com o parasita. Nesse momento, estamos avaliando qual o papel das células T regulatórias nessa resistência.

Com relação à infecção de camundongos BALB/c com *L. amazonensis* pela via intradérmica, sabe-se

que o tamanho do inóculo influencia o desenvolvimento de uma lesão e sua possível progressão até ulceração e necrose⁽²²⁾. Além disso, camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* são incapazes de controlar uma reinfecção, ao contrário de camundongos BALB/c infectados com *L. major*. Essa incapacidade está associada ao desenvolvimento de uma resposta celular mista Th1/Th2.

O Modelo Experimental de Primatas

Os primatas do Novo Mundo são suscetíveis à infecção por *L. braziliensis*⁽³²⁾. A infecção do macaco Rhesus com *L. amazonensis*⁽³⁾ resulta no desenvolvimento de doença semelhante à que ocorre no homem (lesão cutânea com cura espontânea e resistência à infecção homóloga). Mais recentemente, Teva et al.⁽⁴⁸⁾ desenvolveram um modelo de infecção de macacos Rhesus com *L. braziliensis* que facilita o estudo da leishmaniose mucosa. Nesse estudo, os animais foram injetados pela via intradérmica e desenvolveram lesões que variaram em severidade, desde lesão cutânea localizada até lesões que não curaram. Um dos animais infectados desenvolveu lesões dérmicas metastáticas persistentes e lesões mucosas. Observou-se a presença tanto de anticorpos anti-*Leishmania* quanto de uma resposta imune celular. Uma vez que a resposta granulomatosa inflamatória encontrada nos macacos infectados foi similar àquela encontrada em pacientes com leishmaniose cutânea, conclui-se que esse modelo pode ser bastante útil tanto no estudo da patogênese da leishmaniose quanto nos estudos relacionados ao desenvolvimento de vacinas.

Em conclusão, a utilização de camundongos e primatas como modelos experimentais de leishmaniose vem elucidando pontos importantes relacionados ao desenvolvimento da doença e da resposta imune subsequente. Esses modelos permitiram avaliar o papel dos diferentes componentes da resposta imune; e os achados resultantes de tais estudos têm permitido a

visualização de novas estratégias terapêuticas e de novos candidatos a vacinas. O modelo clássico de resistência e susceptibilidade, proposto a partir dos ensaios com *L. major*, permitiu-nos compreender a sintonia que existe entre resposta imune e patogênese. No entanto, resta o desafio de compreender como a *L. braziliensis* e a *L. amazonensis*, espécies que causam um espectro de doenças no homem, se comportam diante desse paradigma. A utilização dos modelos ditos “naturais” de transmissão (infecção intradérmica, presença da saliva do vetor) nos permitirá avançar nesses conhecimentos de maneira mais fiel à biologia da relação patógeno-hospedeiro.

Referências Bibliográficas

1. Aebischer T, Moody SF, Handman E. Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. *Infect Immun* 61: 220-226, 1993.
2. Almeida RP, Barral-Netto M, De Jesus AM, De Freitas LA, Carvalho EM, Barral A. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. *Am J Trop Med Hyg* 54: 178-184, 1996.
3. Amaral VF, Ransatto VA, Conceicao-Silva F, Molinaro E, Ferreira V, Coutinho SG, McMahon-Pratt D, Grimaldi G, Jr. *Leishmania amazonensis*: the Asian rhesus macaques (Macaca mulatta) as an experimental model for study of cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 82: 34-44, 1996.
4. Badolato R, Sacks DL, Savoia D, and Musso T. *Leishmania major*: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. *Exp Parasitol* 82: 21-26, 1996.
5. Balestieri FM, Queiroz AR, Scavone C, Costa VM, Barral-Netto M, Abrahamsen I. de A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect* 4: 23-29, 2002.
6. Barral A, Barral-Netto M, Almeida R, de Jesus AR, Grimaldi Junior G, Netto EM, Santos I, Bacellar O, Carvalho EM. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. *Am J Trop Med Hyg* 47: 587-592, 1992.
7. Barral A, Barral-Netto M, Yong EC, Brownell CE, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3442-3446, 1993.
8. Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 53: 256-259, 1995.
9. Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Junior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44: 536-546, 1991.
10. Barral-Netto M, Cardoso SA, Barral A. Different patterns of disease in two inbred mouse strains infected with a clone of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Acta Trop* 44: 5-11, 1987.
11. Barral-Netto M, da Silva JS, Barral A, Reed S. Up-regulation of T helper 2 and down-regulation of T helper 1 cytokines during murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome enhances susceptibility of a resistant mouse strain to *Leishmania amazonensis*. *Am J Pathol* 146: 635-642, 1995.
12. Barral-Netto M, Von Soest RL, Teixeira M, dos Santos WL, Pompeu ML, Moreira RA, Oliveira JT, Cavada BS, Falcoff E, Barral A. *In vivo* protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop* 60: 237-250, 1996.
13. Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 188: 1941-1953, 1998.
14. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420: 502-507, 2002.
15. Belkaid Y, Von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, Udey MC, Sacks D. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 168: 3992-4000, 2002.
16. Berzunza-Cruz M, Bricaire G, Romero SZ, Perez-Becker R, Saavedra-Lira E, Perez-Montfort R, Crippa-Rossi M, Velasco-Castrejon O, Becker I. *Leishmania mexicana mexicana*: genetic heterogeneity of mexican isolates revealed by restriction length polymorphism analysis of kinetoplast DNA. *Exp Parasitol* 95: 277-284, 2000.
17. Bittencourt A, Barral-Netto M. Leishmaniasis. In: *Tropical Pathology* (2nd ed.), edited by Doerr W SG. Springer, Berlin, 1995, p. 597-651.
18. Bogdan C, Donhauser N, Doring R, Rollinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med* 191: 2121-2130, 2000.

19. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12: 64-76, 2000.
20. Bogdan C, Rollinghoff M, and Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 173: 17-26, 2000.
21. Childs GE, Lightner LK, McKinney L, Groves MG, Price EE, Hendricks LD. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. *Ann Trop Med Parasitol* 78: 25-34, 1984.
22. Courret N, Lang T, Milon G, Antoine JC. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *Int J Parasitol* 33: 1373-1383, 2003.
23. de Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, de Oliveira CI. Towards a novel experimental model of infection to study American Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*, no prelo.
24. DeKrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun* 66: 827-829, 1998.
25. Falcoff R, Barral-Netto M, Stiffel C, Bouthillier Y, Barral A, Freitas LA, Mevel JC, Mouton D. Variations in susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection in lines of mice selected for high or low immunoresponsiveness. *Parasite Immunol* 13: 639-647, 1991.
26. Gomes IN, Calabrich AF, Tavares RS, Wietzerbin J, de Freitas LA, Veras PS. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes Infect* 5: 251-260, 2003.
27. Gummy A, Louis JA, Launois P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Int J Parasitol* 34: 433-444, 2004.
28. Indiani de Oliveira C, Teixeira MJ, Teixeira CR, Ramos de Jesus J, Bomura Rosato A, Santa da Silva J, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes Infect* 6: 977-984, 2004.
29. Ji J, Sun J, and Soong L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 71: 4278-4288, 2003.
30. Jones TC, Johnson WD, Jr., Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis* 156: 73-83, 1987.
31. Kebaier C, Louzir H, Chenik M, Ben Salah A, Dellagi K. Heterogeneity of wild *Leishmania major* isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune response. *Infect Immun* 69: 4906-4915, 2001.
32. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: XII. Observations on cross-immunity in monkeys and man infected with *Leishmania mexicana mexicana*, *L. (M.) amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis*, *L. (B.) guyanensis* and *L. (B.) panamensis*. *J Trop Med Hyg* 80: 29-35, 1977.
33. Lemos de Souza V, Ascencio Souza J, Correia Silva TM, Sampaio Tavares Veras P, Rodrigues de-Freitas LA. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes Infect* 2: 1807-1815, 2000.
34. Lima HC, Titus RG. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun* 64: 5442-5445, 1996.
35. Llanos Cuentas EA, Cuba CC, Barreto AC, Marsden PD. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 845-846, 1984.
36. Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med* 200: 201-210, 2004.
37. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 91: 1390-1395, 1993.
38. Pompeu M, Freitas AL, dosReis GA, Barral-Netto M. T-lymphocytes in experimental *Leishmania amazonensis* infection: comparison between immunized and naive BALB/c mice. *Parasitol Res* 78: 16-22, 1992.
39. Pompeu ML, Freitas LA, Santos ML, Barral A, Barral-Netto M. *Leishmania amazonensis* infection: a comparison of *in vivo* leishmanicidal mechanisms between immunized and naive infected BALB/c mice. *Exp Parasitol* 74: 169-176, 1992.
40. Racoosin EL, Beverley SM. *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp Parasitol* 85: 283-295, 1997.
41. Ramirez JL, Guevara P. Persistent infections by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 333-338, 1997.
42. Ritter U, Moll H, Laskay T, Brocker E, Velazco O, Becker I, Gillitzer R. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis* 173: 699-709, 1996.
43. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2: 845-858, 2002.

44. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531-562, 2004.
45. Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraive W, Pirmez C, Grimaldi G, Jr., Fernandes O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis* 178: 911-914, 1998.
46. Sousa AQ, Parise ME, Pompeu MM, Coelho Filho JM, Vasconcelos IA, Lima JW, Oliveira EG, Vasconcelos AW, David JR, Maguire JH. Bubonic leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceara, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 53: 380-385, 1995.
47. Teixeira MJ, Fernandes JD, Teixeira CR, Andrade BB, Pompeu ML, Santana da Silva J, Brodskyn CI, Barral-Netto M, Barral A. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infect Immun* 73: 1191-1195, 2005.
48. Teva A, Porrozzzi R, Cupolillo E, Pirmez C, Oliveira-Neto MP, Grimaldi G, Jr. *Leishmania (Viannia) braziliensis*-induced chronic granulomatous cutaneous lesions affecting the nasal mucosa in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model. *Parasitology* 127: 437-447, 2003.
49. Theodos CM, Ribeiro JM, Titus RG. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on leishmania infection in mice. *Infect Immun* 59: 1592-1598, 1991.
50. Titus RG, Milon G, Marchal G, Vassalli P, Cerottini JC, Louis JA. Involvement of specific Lyt-2+ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol* 17: 1429-1433, 1987.

Papel do Parasita e do Hospedeiro na Expressão Clínica das Leishmanioses

Host and Parasite Roles in the Clinical Outcome of Leishmaniasis

Ana Lúzia F. Schriefer¹, Rosana S. Sousa¹, Luiz Henrique Guimarães¹, Aristóteles Góes-Neto³, Albert Schriefer^{1,2}
Serviço de Imunologia¹, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, UFBA; Departamento de Ciências da Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde², UFBA; Salvador, BA; Laboratório de Pesquisa em Microbiologia³, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana; Feira de Santana, BA, Brasil

As leishmanioses constituem um espectro de formas clínicas de origem multifatorial. Camundongos isogênicos infectados com diferentes espécies e cepas do microorganismo apresentam cursos infecciosos diversos, indicando a importância de fatores parasitários da doença. Por outro lado, um mesmo isolado ou cepa de *Leishmania* sp. é capaz de levar a cursos distintos quando inoculados em animais de diferentes linhagens, mostrando o papel do conteúdo genético do hospedeiro no desfecho da infecção. Esses dados experimentais são reforçados por achados epidemiológicos, mostrando uma grande diversidade nas populações naturais dos integrantes desse gênero e associações entre determinadas espécies e cepas com formas viscerais ou tegumentares da doença humana. O presente texto revisa as principais contribuições que têm resultado em uma melhor compreensão sobre a variabilidade clínica das infecções por *L. chagasi*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, causadores das leishmanioses no estado da Bahia, e seus determinantes.

Palavras-chave: Leishmaniose, variabilidade clínica, polimorfismo parasitário.

*Leishmaniasis correspond to a spectrum of clinical outcomes of multi-factorial origin. Syngeneic mice infected with different species and strains of the parasite present diverse infectious courses, indicating a role for parasite factors in the disease. On the other hand, a single strain or clinical isolate of Leishmania sp. can lead to diverse outcomes if inoculated into different mice lineages, attesting to the role of the host's genetic background in the outcome of the infection. These experimental data are reinforced by epidemiological findings showing a marked diversity within and between natural populations of these organisms in addition to associations of species or strains with visceral or tegumentary forms of the human disease. This manuscript reviews the most important scientific contributions that have increased our understanding on the clinical variability of infections with *L. chagasi*, *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, the major causative agents of leishmaniasis in the state of Bahia/Brazil.*

Key words: Leishmaniasis, clinical variability, parasite polymorphism.

Recebido em 22/02/2005 Aceito em 27/05/2005
Endereço para correspondência: Dra. Ana Lúzia Fernandes Schriefer. Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia. Rua João das Botas s/n, 5º andar, Canela. 40.110-160. Salvador/Bahia/Brasil. Telefone: (5571) 3237-7353. Fax: (5571) 3245-7110. E-mail: aschriefer@hupes.ufba.br

Gazeta Médica da Bahia 2005;75(1):Jan-Jun:46-56.
© 2005 Gazeta Médica da Bahia (ISSN 0016-545X).
Todos os direitos reservados.

As leishmanioses constituem um importante problema de saúde pública mundial. O Brasil figura entre os cinco países mais afetados⁽⁵¹⁾, apresentando incidências crescentes dessas enfermidades. Dentre as várias unidades da Federação, a Bahia corresponde a uma das áreas de maior endemicidade. Uma das mais marcantes características das leishmanioses nesse Estado é a grande riqueza de quadros clínicos observada, ora representada por doença visceral (leishmaniose visceral americana, LVA), ora por

diversas manifestações tegumentares (leishmaniose tegumentar americana, LTA). Essa riqueza se justifica por fatores relacionados ao hospedeiro e pela presença de três espécies de *Leishmania* envolvidas nas infecções humanas: *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

A capacidade divergente dos agentes etiológicos das leishmanioses tem sido reconhecida há muito tempo, sendo exemplificada pelas cerca de 15 espécies de importância médica até então detectadas^(47,48). A plasticidade dos integrantes do gênero *Lesh* tem conferido poder adaptativo a condições ecológicas diversas, envolvendo diferentes paisagens, reservatórios e vetores, o que justifica a ampla distribuição global e parte da variabilidade de apresentações clínicas das doenças humanas. Todavia, a freqüente implicação de uma única espécie do parasita em mais de uma forma de leishmaniose, com gravidades e respostas terapêuticas distintas, tem sugerido que essa plasticidade estende-se ao nível intra-específico.

Os efeitos da variação intra-específica das leishmanias sobre os desfechos das infecções têm sido avaliados explorando-se linhagens de camundongos isogênicos e hamsters. Nesses experimentos, animais com conteúdos genéticos semelhantes são inoculados com diferentes cepas dos parasitas e parâmetros como infectividade, virulência e apresentação clínica são comparados. A variabilidade detectada no comportamento das cepas de *Leishmania* sp. nos trabalhos experimentais tem sido acompanhada pela identificação de um grande polimorfismo entre esses microorganismos no campo, em estudos que têm buscado correlacionar isolados naturais e apresentações da doença humana^(22,41,44,49). Comparando-se os conteúdos de isoenzimas dos parasitas, as diferenças nas reatividades de seus extratos antigênicos contra painéis de anticorpos monoclonais, ou seus genótipos moleculares, tem-se mostrado a existência de subpopulações geneticamente distintas numa mesma espécie, tanto em grandes quanto em pequenas áreas geográficas. Algumas vezes, essa variabilidade tem sido acompanhada de significativa associação entre genótipo ou fenótipo microbiano e curso da leishmaniose.

Dados experimentais e observações epidemiológicas têm também enfatizado a importância da carga genética e do estado imunológico do hospedeiro sobre as infecções, deixando claro que os desfechos das leishmanioses têm origens multifatoriais complexas. No presente texto, serão revisados estudos que abordam os determinantes da variabilidade clínica observada nas doenças causadas por *L. chagasi*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Serão levados em consideração os principais trabalhos de pesquisadores ligados ao estado da Bahia, além de contribuições relevantes de outros grupos.

O Estado Imunológico do Hospedeiro Exerce Grande Influência sobre o Curso da Infecção pela *Leishmania chagasi*

A *L. chagasi* tem sido a principal responsável pelos casos de LVA na Bahia⁽²⁸⁾. Essa doença consiste em uma forma de hepatoesplenomegalia febril, acompanhada de anemia e episódios recorrentes de infecções secundárias, que põem em risco a vida dos pacientes. Imunologicamente, a doença se caracteriza por uma baixa resposta celular aos antígenos do parasito e hipergamaglobulinemia às custas de ativação policlonal de linfócitos B⁽³⁵⁾.

Em um importante trabalho, Badaró et al.⁽⁴⁾ chamaram a atenção sobre a importância do estado imune do hospedeiro na expressão da LVA por *L. chagasi*. Foram descritos três casos: (1) paciente com colite ulcerativa sob terapêutica corticosteroide; (2) paciente com glomerulonefrite proliferativa sob tratamento com corticosteroide e ciclofosfamida; e (3) um paciente com forma hepatoesplênica de esquistossomose, apresentando bacteremia por salmonela, em tratamento com cloranfenicol. Em todos esses pacientes, o estado de comprometimento da resposta imune se fez acompanhar por provável ativação de infecções latentes, resultando em doença progressiva.

Bittencourt et al.⁽¹⁴⁾ deram um outro exemplo de como o estado imunológico do hospedeiro pode

influenciar profundamente o curso da LVA ao relatarmos o caso de um jovem de 28 anos que, tendo desenvolvido a síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), apresentou leishmaniose visceral como infecção oportunista, seguida de leishmaniose dérmica pós-calazar (*post-kalazar dermal leishmaniasis*, PKDL). A PKDL é comumente resultante de infecção por *L. donovani* e limitada ao Velho Mundo, sendo inesperada em um paciente do Novo Mundo. Um trabalho experimental de Barbosa et al.⁽⁶⁾, em que camundongos C57BL/10, susceptíveis à *L. chagasi*, demoravam mais a controlar a infecção que os resistentes DBA/2, ajuda a completar a nossa compreensão sobre a contribuição do hospedeiro à expressão clínica da LVA, sugerindo uma importante participação tanto do seu estado imunológico quanto da sua carga genética.

O entendimento acerca do papel do polimorfismo da *L. chagasi* sobre a LVA é mais limitado. A *L. chagasi* e a *L. infantum* são filogeneticamente muito próximas, compartilhando um mesmo nodo no complexo *Leishmania donovani*^(17,37). Suspeita-se que a *L. chagasi* atual descenda de uma ou várias cepas de *L. infantum* introduzidas no Brasil após o descobrimento^(37,38). Portanto, espera-se que parte dos achados relativos à *L. infantum* devam ser extrapoláveis e eventualmente confirmados na LVA por *L. chagasi*.

Diversos trabalhos têm indicado que uma marcada variabilidade intra-específica caracteriza a *L. infantum*. Avaliações dos perfis de isoenzimas têm mostrado que as cepas mediterrâneas desses parasitas pertencem a inúmeros zimodemas^(25,26,32,40), ao passo que métodos moleculares com elevada capacidade discriminativa têm revelado polimorfismo mesmo entre integrantes de um mesmo zimodema^(5,30,49). Num exemplo de potencial relevância clínica e epidemiológica, foi detectada uma grande heterogeneidade no zimodema MON1, levando os autores a sugerirem que isso talvez reflita parte das inconsistências referentes à infecção com esses parasitos^(5,30). É importante lembrar que essa é uma das poucas subpopulações de *L. infantum* até então envolvidas tanto em doença visceral quanto tegumentar no Velho Mundo^(12,24,27,29,30,40).

Os estudos com *L. infantum* também são bastante esclarecedores quanto ao papel do hospedeiro no curso da LV, reforçando o que foi colocado acima sobre as infecções por *L. chagasi*. Diferentes estudos têm evidenciado formas clínicas atípicas em imunocomprometidos infectados por certos zimodemas do parasita. Por exemplo, MON 24, MON 29 e MON 33, que são normalmente dermatrópicos, têm sido encontrados causando doença visceral nesses pacientes^(39,40). Por outro lado, integrantes de certos zimodemas tendem a ser mais freqüentemente ou exclusivamente isolados desses indivíduos com comprometimento da resposta imune^(27,32). É possível que isso corresponda, em parte, à contrapartida no Velho Mundo das observações sobre a ativação de infecções latentes entre imunossuprimidos descritas por Badaró et al.⁽⁴⁾ na Bahia.

Parasito e Hospedeiro Contribuem para o Polimorfismo Clínico das Infecções por *Leishmania amazonensis*

A *L. amazonensis* tem sido associada, sobretudo, a uma parcela dos casos de leishmaniose cutânea localizada (LC)⁽²⁸⁾, com características clínicas e imunológicas semelhantes às abaixo descritas para a doença por *L. braziliensis*. Mais raramente, tem sido também observada doença difusa por esses parasitas, em que predominam lesões nodulares e infiltrativas, ricas em macrófagos infectados por amastigotas⁽³⁵⁾. Contudo, Barral et al.^(7,8) identificaram uma marcada variabilidade nos desfechos clínicos das infecções por integrantes dessa espécie no estado da Bahia. Em um primeiro trabalho, esses autores reportaram o isolamento de *L. amazonensis* a partir de aspirado de medula óssea de um paciente com LVA, que foi descrito como o primeiro caso humano de LV causado por *L. amazonensis*. A identidade do parasita foi checada por meio de reatividade a anticorpos monoclonais e avaliação de perfil isoenzimático. Expandindo esses achados, após avaliar 114 casos de leishmaniose e caracterizar as espécies de parasita envolvidas por meio de monoclonais, Barral et al.

detectaram que a *L. amazonensis*, proveniente de áreas endêmicas baianas, pode ser isolada não apenas de casos de leishmaniose cutânea localizada, cutânea difusa (LCD) e visceral como previamente descrito, mas também de leishmaniose mucosa (LM) e até mesmo de PKDL. Essas observações levaram os autores a concluir que a *L. amazonensis* é capaz de causar um amplo espectro de doenças⁽⁸⁾.

Reforçando a existência de uma marcante variabilidade de quadros clínicos secundários à infecção por esses parasitas, Bittencourt et al.⁽¹³⁾ descreveram um caso humano atípico de LCD. Nele, as lesões infiltrativas eram acompanhadas por uma ulceração profunda e extensa, em cujo infiltrado inflamatório se encontrava um elevado número de eosinófilos. Em um outro trabalho, Barral et al.⁽⁹⁾ descreveram que a forma difusa de leishmaniose era mais heterogênea do que se suspeitava anteriormente. Nesse estudo, que envolveu seis pacientes, foi descrito que a LCD apresenta um espectro de comportamentos imunológicos. Em um extremo, que os autores chamaram de forma polar da LCD, os pacientes ou suas células imunes eram incapazes de responder à estimulação com antígenos de leishmania, ao passo que na forma denominada de subpolar podia ser detectada uma resposta, ainda que fraca, aos extratos do parasita.

Uma série de trabalhos experimentais empregando *L. amazonensis* e linhagens murinas isogênicas evidenciaram que parte da variabilidade clínica descrita acima, provavelmente, é influenciada pela carga genética do hospedeiro e o seu estado imunológico. Ainda na década de 80, Barral-Netto et al.⁽¹⁰⁾ mostraram que um mesmo clone de *L. amazonensis* era capaz de causar infecções com características distintas entre duas linhagens de animais geneticamente diferentes, BALB/c e C57BL/6. Esses autores confirmaram e estenderam dados previamente publicados por outros grupos, que tinham como ponto fraco o emprego de populações mistas do parasita em seus inóculos. Nesse trabalho, camundongos BALB/c se mostraram susceptíveis à infecção, ao passo que C57BL/6 foram resistentes. Além do mais, a linhagem susceptível apresentava perda da resposta imune celular contra o parasita, evidenciada pela negatização

dos testes de hipersensibilidade tardia aos antígenos de leishmania. Empregando inúmeras linhagens murinas, Falcoff et al.⁽²³⁾ confirmaram o importante papel dessas respostas imunes geneticamente condicionadas aos antígenos dos parasitas sobre o curso das infecções por *L. amazonensis*.

Ao mostrarem que camundongos naturalmente resistentes à *L. amazonensis* se tornavam susceptíveis quando infectados com um retrovírus capaz de induzir à imunodeficiência, Barral-Netto et al.⁽¹¹⁾ estenderam a nossa compreensão sobre o papel do hospedeiro na doença por esses microorganismos. Animais infectados apenas com o parasito apresentavam lesões transitórias, que freqüentemente evoluíam para a cura espontânea. Por outro lado, animais previamente infectados com o vírus da leucemia murina (Mu-LV), portanto tornados imunodeficientes, desenvolviam grandes lesões, que não apresentavam tendência à cura, atestando também o papel do estado imunológico do hospedeiro sobre a leishmaniose experimental e potencialmente humana pela *L. amazonensis*.

Importantes contribuições para a compreensão da variabilidade intra-específica de isolados naturais da *L. amazonensis* foram feitas por Leon et al.^(33,34). Nesses trabalhos, foi investigada a existência de diferenças antigênicas entre isolados provenientes de uma mesma manifestação clínica (LCD) ou de diferentes formas de leishmaniose (LC, LM, LCD, LV e PKDL). Utilizando-se de painéis de soros de pacientes com leishmaniose para esse fim, os autores mostraram a presença de heterogeneidade fenotípica entre esses microorganismos. Contudo, associações entre fenótipo parasitário e forma clínica ou distribuição geográfica das doenças não foram detectadas.

Embora as avaliações epidemiológicas de Leon et al. não tenham permitido detectar uma associação entre cepas de *L. amazonensis* e desfechos da LTA, um estudo de Almeida et al.⁽¹⁾ ajudou na melhor compreensão da importância que a variabilidade entre esses parasitas apresenta sobre a resposta clínica e imunológica do hospedeiro. Os autores reportaram que *L. amazonensis* isoladas de pacientes com diferentes formas de leishmaniose apresentavam comportamentos biológicos distintos em animais de experimentação.

Parasitas isolados de casos de LC, LM e LV eram inoculados nas patas de camundongos BALB/c e os cursos das infecções avaliados. Como principais resultados, as *L. amazonensis* obtidas de casos de LTA causavam lesões ulcerativas nas patas dos animais, caracterizadas por grande destruição tecidual e presença de macrófagos carregados de amastigotas. Em marcado contraste, a infecção causada pelos parasitas cultivados a partir de pacientes com LVA era facilmente controlada pelos hospedeiros, sendo caracterizada por pequenas lesões nas patas inoculadas, onde se encontrava um infiltrado de células mononucleares, poucos macrófagos parasitados e granulomas. Os autores interpretaram esses achados como indicativos da provável relevância clínica da variabilidade intra-específica da *L. amazonensis*.

O Papel da Variabilidade Intra-Específica da *Leishmania braziliensis* sobre o Desfecho Clínico da Leishmaniose Tegumentar Americana

As infecções por *L. braziliensis* têm-se mostrado igualmente ricas em suas formas clínicas e ainda mais prevalentes que aquelas por *L. chagasi* e *L. amazonensis* nas áreas endêmicas baianas. Mais freqüentemente, os integrantes dessa espécie têm sido implicados nas formas cutânea localizada e mucosa da LTA^(28,35). A LC é normalmente limitada a uma ou poucas úlceras na pele, mais freqüentes nas áreas descobertas do corpo. O quadro imunológico é caracterizado por uma resposta imune do tipo Th1 moderada e bem regulada contra a leishmaniana⁽²⁾. Até 4% dos pacientes de LC evoluem para LM, que consiste na mais grave complicação da leishmaniose tegumentar americana. A LM afeta sobretudo as mucosas oral, nasal e faríngea, sendo a resposta do hospedeiro aos antígenos do parasito caracterizada pela produção exacerbada das citocinas inflamatórias TNF- α e IFN- γ ^(3,36).

Além das formas cutânea localizada e mucosa, uma forma emergente tem sido identificada no estado da Bahia, denominada de leishmaniose disseminada (LD) pelos investigadores que a têm descrito e

caracterizado^(15,16,50). A LD se caracteriza pela presença de grande número de lesões acneiformes, papulares e ulceradas, distribuídas por mais de uma área da superfície corpórea dos pacientes. As células imunes desses indivíduos produzem menos TNF- α e IFN- γ frente à estimulação com antígenos de leishmaniana que aquelas de pacientes de LC⁽⁵⁰⁾. Desde cedo foi percebido que a LD se tratava de uma nova entidade clínica^(15,16) diferente da leishmaniose cutânea difusa, normalmente causada pela *L. amazonensis*. A emergência da LD é a expressão clínica da grande capacidade de diversificação e adaptação da *L. braziliensis*, também refletidas em sua habilidade de colonizar novos ecótopos, o que lhe confere uma ampla distribuição geográfica no continente americano^(18,19,28).

Diversos estudos epidemiológicos têm tentado associar a forma de LTA a subpopulações de *L. braziliensis* genotipicamente ou fenotipicamente distintas. Empregos de isolados provenientes de áreas geográficas distantes e de múltiplas fontes (e.g. vetores, reservatórios e hospedeiros humanos HIV⁺ e HIV⁻) em uma mesma avaliação são alguns dos motivos que têm dificultado essas análises. Visando a minorar esses problemas, um estudo de Schriefer et al.⁽⁴⁵⁾ avaliou detalhadamente a estrutura populacional da *L. braziliensis* em uma área endêmica para LTA, bem delimitada no sudeste do estado da Bahia. Essa área, denominada de Corte de Pedra, compreende vinte municípios, estendendo-se por, aproximadamente, 10.000 Km², em uma faixa coberta pela Mata Atlântica (Figura 1), onde as três formas de doença secundárias à *L. braziliensis*, acima descritas, podem ser encontradas.

O polimorfismo genotípico entre as *L. braziliensis* provenientes de casos de LC, LM e LD de Corte de Pedra foi avaliado empregando-se diversos protocolos de RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) como ferramentas. Para cada parasita testado, o RAPD gera um perfil eletroforético de bandas, o genótipo molecular, que é comparado com aqueles dos outros integrantes da amostra avaliada, permitindo inferir sobre a homogeneidade genética dos microorganismos da região. Os resultados desse estudo revelaram uma população polimórfica com estrutura

multiclinal, formada por diversas subpopulações, denominadas de clados, correspondentes a grupos de clones genotipicamente mais semelhantes entre si (Figura 2). Contudo, uma das principais contribuições desse trabalho foi a detecção de uma associação estatisticamente significativa entre clados de *L. braziliensis* e a forma da doença humana em Corte de Pedra (Tabela 1).

A identificação de uma população com estrutura multiclinal e da associação entre clados do parasito e forma de leishmaniose abrem a perspectiva de se detectar polimorfismos cepa-específicos para as *L. braziliensis*. Esses marcadores genéticos poderiam ser explorados no desenvolvimento de ferramentas diagnósticas com valor preditivo sobre os desfechos das doenças e respostas terapêuticas dos pacientes. Seu principal emprego seria no melhor manejo dos casos de LM. A identificação de infecções por cepas associadas à LM permitiria um acompanhamento mais cuidadoso dos pacientes envolvidos, mesmo após a cura da lesão inicial na pele, maximizando o diagnóstico de acometimentos metastáticos em estágios precoces e ajudando no combate às formas mais mutilantes.

Dois estudos recentes por Saravia et al.^(42,43) na Colômbia somam-se aos achados acima para reforçar a importância da variabilidade intra-específica da *L. braziliensis* na forma de LTA. Os autores avaliaram os perfis isoenzimáticos e de reatividade contra um painel de anticorpos monoclonais de mais de mil parasitas de diferentes espécies, isolados de casos humanos de LC e LM. Em um dos trabalhos, foi detectada uma frequência aumentada de envolvimento de mucosas entre casos humanos secundários à infecção por um determinado zimodema de *L. braziliensis*⁽⁴²⁾. No outro, achados semelhantes foram descritos para um grupo de cepas sorologicamente nulas dessa espécie⁽⁴³⁾. Além do mais, a evolução da doença naqueles infectados com parasitos do zimodema referido no primeiro estudo acima mostrou-se estatisticamente mais longa ($p=0,002$) do que aquela causada por outras cepas⁽⁴²⁾.

Dados experimentais, recentemente publicados^(31,46), reforçam os achados epidemiológicos sobre a importância da variabilidade intra-específica da *L.*

braziliensis no curso da LTA. Indiani et al.⁽³¹⁾ e Teixeira et al.⁽⁴⁶⁾ mostraram que *L. braziliensis* obtidas de diferentes formas de doença humana, ou provenientes de áreas geográficas diversas podem apresentar comportamentos biológicos distintos em animais de laboratório. No primeiro estudo, foram comparados dois isolados clínicos provenientes de casos de LC: um do Ceará (H3227), outro da Bahia (BA788). À inoculação na pata, camundongos BALB/c infectados com H3227 desenvolveram lesão, ao passo que aqueles infectados com BA788, não. Além disso, a comparação das células provenientes dos linfonodos responsáveis pela drenagem dos sítios de inoculação mostrou diferenças entre os dois grupos de animais. Células obtidas com pouco tempo de infecção por BA788 produziram significativamente mais interferon gama, enquanto que células de camundongos infectados com H3227, obtidas mais tardiamente, mostraram-se maiores produtoras de IL-12p70 e IL-10. Reforçando o papel da variabilidade intra-específica entre *L. braziliensis* na resposta imune do hospedeiro, o segundo trabalho mostrou que cepas distintas eram capazes de induzir diferentes cinéticas de expressão de quimiocinas nos sítios de inoculação nos animais, o que era acompanhado de recrutamentos celulares e respostas inflamatórias diversos nesses locais.

O Desafio que a Variabilidade entre as Leishmanias Impõe sobre o Tratamento e a Prevenção das Leishmanioses

Embora fatores dos hospedeiros e dos parasitas componham os cenários que condicionam os vários desfechos clínicos e terapêuticos das leishmanioses, certamente as leishmanias constituem os alvos principais para o controle das endemias. Isso torna a marcante e aparentemente crescente variabilidade dos integrantes do gênero um desafio a ser enfrentado para o efetivo tratamento e profilaxia dessas doenças. Dois estudos ilustram bem como os pontos em comum entre esses microorganismos podem ser detectados e explorados com esses objetivos. De Sousa et al.⁽²¹⁾ mostraram que o gene da DNA topoisomerase II (TOP2) da *L.*

Figura 1. Mapa da Bahia destacando em cinza a localização dos municípios do sudeste do estado que perfazem a área endêmica para leishmaniose tegumentar americana denominada Corte de Pedra.

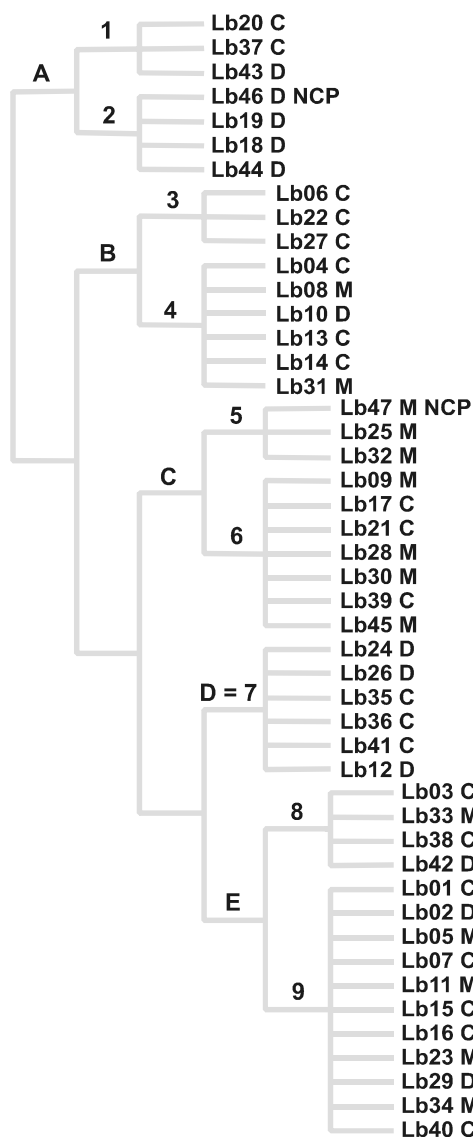


Tabela 1. Distribuição das frequências de casos humanos de leishmaniose cutânea localizada (LC), mucosa (LM) e disseminada (LD) entre três grupos de clados de *Leishmania braziliensis* (descritos na Figura 2) existentes na área endêmica para leishmaniose tegumentar americana de Corte de Pedra/BA.

CLADOS	LC	LM	LD	n
A+D	5*	0**	8***	13
B+E	13*	7**	4***	24
C	3*	7**	0***	10
n	21	14	12	47

*p=0,001, **p=0,03, ***p=0,02, frequências comparadas por qui-quadrado.

Figura 2. Dendrograma mostrando os cinco clados (A a E) e os nove clones (1 a 9) de *Leishmania braziliensis* (Lb) existentes na área endêmica para leishmaniose tegumentar americana de Corte de Pedra. A estratificação dos 47 (números 1 a 47 nas extremidades dos galhos terminais) parasitas isolados de casos clínicos de leishmaniose cutânea (C), mucosa (M) e disseminada (D), distribuídos na árvore, foi realizada com base em seus genótipos moleculares por meio de *unweighted pair group matrix analysis* (UPGMA) conforme a referência ⁽⁴⁵⁾. Os dois isolados contendo a notação NCP são provenientes do estado da Bahia, porém não pertencentes a Corte de Pedra.



chagasi apresenta elevado grau de homologia com aqueles de outras espécies de *Leishmania*, em contraste com uma baixa identidade ao TOP2 humano. Uma vez que a DNA topoisomerase II é uma enzima essencial para a replicação celular, esses achados apontam um caminho para o desenvolvimento de novas modalidades de tratamento com amplo espectro contra esses parasitas. Já De Carvalho *et al.* ⁽²⁰⁾ identificaram antígenos imunodominantes que, a despeito de terem sido originalmente obtidos de *L. infantum*, são reconhecidos por células e anticorpos de pacientes de diferentes formas de LTA e LVA, sugerindo que o desenvolvimento de um único reagente para a imunoprofilaxia das leishmanioses, embora difícil, é uma tarefa factível.

Referências Bibliográficas

1. Almeida RP, Barral-Netto M, De Jesus AM, De Freitas LA, Carvalho EM, Barral A. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54:178-184, 1996.
2. Azulay RD & Azulay Junior DR. Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. *International Journal of Dermatology* 34: 303-307, 1995.
3. Bacellar O, Lessa HA, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity* 70: 6734-6740, 2002.
4. Badaro R, Carvalho EM, Rocha H, Queiroz AC, Jones TC. *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. *The Lancet* 22: 647-649, 1986.
5. Banuls AL, Hide M, Tibayrenc M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. *International Journal of Parasitology* 29: 1137-1147, 1999.
6. Barbosa Junior AA, Andrade ZA, Reed SG. The pathology of experimental visceral leishmaniasis in resistant and susceptible lines of inbred mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 20: 63-72, 1987.
7. Barral A, Badaro R, Barral-Netto M, Grimaldi G Jr, Momen H, Carvalho EM. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35: 732-734, 1986.
8. Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Junior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 536-546, 1991.
9. Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *International Journal of Dermatology* 34: 474-479, 1995.
10. Barral-Netto M, Cardoso SA, Barral A. Different patterns of disease in two inbred mouse strains infected with a clone of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Acta Tropica* 44: 5-11, 1987.
11. Barral-Netto M, da Silva JS, Barral A, Reed S. Up-regulation of T helper 2 and down-regulation of T helper 1 cytokines during murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome enhances susceptibility of a resistant mouse strain to *Leishmania amazonensis*. *American Journal of Pathology* 146: 635-642, 1995.
12. Belhadj S, Pratlong F, Hammami M, Kallel K, Dedet JP, Chaker E. Human cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in the Sidi Bourouis focus (Northern Tunisia): epidemiological study and isoenzymatic characterization of the parasites. *Acta Tropica* 85: 83-86, 2003.
13. Bittencourt AL, Barral A, Costa JM, Saldanha AC, Badaro R, Barral-Netto M, Freitas LA. Diffuse cutaneous leishmaniasis with atypical aspects. *International Journal of Dermatology* 31: 568-570, 1992.
14. Bittencourt A, Silva N, Straatmann A, Correia Nunes VL, Follador I, Badaró R. Post-kala-azar Dermal Leishmaniasis Associated With AIDS. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 7: 229-233, 2003.
15. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 56: 315-325, 1994.
16. Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhaes AV, Barreto AC. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 89: 319-323, 1986.
17. Croan DG, Morrison DA, Ellis JT. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* 89: 149-159, 1997.
18. Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50: 296-311, 1994.

19. Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A, de Farias Naiff M, Grimaldi G Jr. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 3126-3132, 2003.
20. de Carvalho LP, Soto M, Jeronimo S, Dondji B, Bacellar O, Luz V, Orge Orge G, Alonso C, Jesus AR, Carvalho EM. Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes and Infection* 5: 7-12, 2003.
21. De Sousa JM, Lareau SM, Pearson RD, Carvalho EM, Mann BJ, Jerônimo SM. Characterization of *Leishmania chagasi* DNA topoisomerase II: a potential chemotherapeutic target. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 35: 826-829, 2003.
22. El Tai NO, El Fari M, Mauricio I, Miles MA, Oskam L, El Safi SH, Presber WH, Schonian G. *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Experimental Parasitology* 97: 35-44, 2001.
23. Falcoff R, Barral-Netto M, Stiffel C, Bouthillier Y, Barral A, Freitas LA, Mevel JC, Mouton D. Variations in susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection in lines of mice selected for high or low immunoresponsiveness. *Parasite Immunology* 13: 639-647, 1991.
24. Frank C, Hadziandoniou M, Pratlong F, Garifallou A, Rioux JA. *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* responsible for cutaneous leishmaniasis in Greece: sixteen autochthonous cases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 87: 184-185, 1993.
25. Gallego M, Pratlong F, Fisa R, Riera C, Rioux JA, Dedet JP, Portus M. The life-cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of *L. infantum* zymodemes in the Old World. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95: 269-271, 2001.
26. Gallego M, Pratlong F, Riera C, Munoz C, Ribera E, Fisa R, Rioux JA, Dedet JP, Portus M. Isoenzymatic identification of *Leishmania* isolates from repeated clinical human leishmaniasis episodes in Catalonia (Spain). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96: 45-47, 2002.
27. Gramiccia M, Gradoni L, Troiani M. Heterogeneity among zymodemes of *Leishmania infantum* from HIV-positive patients with visceral leishmaniasis in south Italy. *FEMS Microbiology Letters* 128: 33-38, 1995.
28. Grimaldi G Jr, David JR, McMahon-Pratt D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36: 270-287, 1987.
29. Harrat Z, Pratlong F, Belazzoug S, Dereure J, Deniau M, Rioux JA, Belkaid M, Dedet JP. *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 90: 625-629, 1996.
30. Hide M, Banuls AL, Tibayrenc M. Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology* 123: 425-432, 2001.
31. Indiani de Oliveira C, Teixeira MJ, Teixeira CR, Ramos de Jesus J, Bomura Rosato A, Santa da Silva J, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes and Infection* 6: 977-984, 2004.
32. Jimenez M, Ferrer-Dufol M, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Molina R, Laguna F, Lopez-Velez R, Cercenado E, Dauden E, Blazquez J. Variability of *Leishmania (Leishmania) infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. *FEMS Microbiology Letters* 131: 197-204, 1995.
33. Leon LL, Machado GM, Paes LE, Grimaldi Junior G. Antigenic differences of *Leishmania amazonensis* isolates causing diffuse cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84: 678-680, 1990.
34. Leon LL, Machado GM, Barral A, de Carvalho-Paes LE, Grimaldi Junior G. Antigenic differences among *Leishmania amazonensis* isolates and their relationship with distinct clinical forms of the disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87: 229-234, 1992.
35. Marsden PD & Jones TC. *Leishmaniasis*. 1ª Edição, Elsevier Science Publisher: Amsterdam, 1985.
36. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80: 859-876, 1986.
37. Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* 119: 237-246, 1999.
38. Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today* 16: 188-189, 2000.
39. Pratlong F, Dedet JP, Marty P, Portus M, Deniau M, Dereure J, Abranches P, Reynes J, Martini A, Lefebvre M. *Leishmania*-human immunodeficiency virus coinfection in the Mediterranean basin: isoenzymatic characterization of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *Journal of Infectious Diseases* 172: 323-326, 1995.
40. Pratlong F, Rioux JA, Marty P, Faraut-Gambarelli F, Dereure J, Lanotte G, Dedet JP. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 4077-4082, 2004.

41. Reiner NE, Lo R, Llanos-Cuentas A, Guerra H, Button LL, McMaster WR. Genetic heterogeneity in Peruvian *Leishmania* isolates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41: 416-421, 1989.
42. Saravia NG, Segura I, Holguin AF, Santrich C, Valderrama L, Ocampo C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59: 86-94, 1998.
43. Saravia NG, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama L, Valencia AZ, Escorcia B, McMahon-Pratt D. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania viannia* in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66: 738-744, 2002.
44. Schonian G, Schnur L, El Fari M, Oskam L, Kolesnikov AA, Sokolowska-Kohler W, Presber W. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95: 217-224, 2001.
45. Schriefer A, Schriefer ALF, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, Ribeiro de Jesus A, Riley LH, Carvalho EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis (ATL). *Infection and Immunity* 72: 508-514, 2004.
46. Teixeira MJ, Fernandes JD, Teixeira CR, Andrade BB, Pompeu ML, Santana da Silva J, Brodskyn CI, Barral-Netto M, Barral A. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infection and Immunity* 73: 1191-1195, 2005.
47. Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Phylogenetic Taxonomy of New World *Leishmania*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 68: 104-106, 1993.
48. Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 68: 107-108, 1993.
49. Toledo A, Martin-Sanchez J, Pesson B, Sanchiz-Marin C, Morillas-Marquez F. Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. *Molecular and Biochemical Parasitology* 119: 257-264, 2002.
50. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *Journal of Infectious Diseases* 186: 1829-1834, 2002.
51. World Health Organization. Extraído de <http://www.who.int/topics/leishmaniasis>.

Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar

Immunopathogenesis of Tegumentary Leishmaniasis

Lucas P. Carvalho, Sara T. Passos, Amélia Ribeiro Jesus

Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

A resposta imune tem um papel importante na patogênese da leishmaniose tegumentar. Na leishmaniose cutânea e na leishmaniose mucosa, uma intensa resposta tipo 1, com alta produção de IFN- γ e TNF- α , é observada. Esse tipo de resposta inflamatória, apesar de estar associada ao controle da multiplicação e disseminação do parasita, se não modulada, pode causar dano tecidual. Por outro lado, a diminuição ou ausência de resposta tipo 1 e presença de citocinas regulatórias como IL-10, observada em indivíduos com leishmaniose disseminada e leishmaniose cutânea difusa, favorece a multiplicação e disseminação do parasita. Indivíduos com infecção assintomática por *L. braziliensis* apresentam uma resposta imune modulada, que não só controla o parasitismo como também previne o dano tecidual.

Palavras-chave: Leishmaniose, citocinas, imunopatogênese.

*The immune response plays an important role in the pathogenesis of tegumentary leishmaniasis. Patients with cutaneous and mucosal leishmaniasis have an exacerbated type 1 immune response with high secretion of IFN- γ and TNF- α . These immune responses, although is associated with the control of the parasite multiplication and dissemination, if not modulated, can cause tissue damage. On the other hand, the decrease or absence of type 1 immune response and presence of regulatory cytokines such as IL-10, observed in diffuse and disseminated leishmaniasis, allows parasite multiplication and dissemination. Individuals with asymptomatic *L. braziliensis* infection have a modulated immune response, which not only controls the parasitism but also prevents tissue damage.*

Key words: Leishmaniasis, cytokines, immunopathogenesis.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) se apresenta clinicamente sob 4 formas distintas da doença: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa, leishmaniose disseminada e leishmaniose cutânea difusa. A leishmaniose cutânea, a leishmaniose mucosa e a leishmaniose disseminada no Nordeste brasileiro são causadas, principalmente, pela *L. braziliensis*; e a

leishmaniose difusa, pela *L. amazonensis*. Além disso, cerca de 10% dos indivíduos residentes em área endêmica apresentam teste de hipersensibilidade tardia a antígeno de leishmania positivo e não desenvolvem a doença, caracterizando uma forma subclínica de LTA⁽¹⁹⁾. Por ser um organismo intracelular obrigatório, o principal mecanismo de defesa contra a leishmania é a produção de IFN- γ , necessária para ativação de macrófagos e síntese de derivados do O₂ a exemplo do óxido nítrico (NO) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂)^(28,30,31). Estudos em modelos experimentais de leishmaniose demonstraram que a resposta Th1 ou tipo 1, associada à produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α , observada em camundongos C57Bl-6, está ligada à resistência ao patógeno e cura espontânea da lesão, enquanto que a resposta tipo 2, caracterizada pela

Recebido em 22/02/2005

Aceito em 27/05/2005

Endereço para correspondência: Dr. Edgar M. Carvalho, Serviço de Imunologia, 5º andar, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n Canela, 40110-160, Salvador, BA, Brasil. Tel.: 55 71 3237-7353; Fax: 55 71 3245-7110. E-mail: imuno@ufba.br

Gazeta Médica da Bahia 2005;75(1):Jan-Jun:57-65.

© 2005 Gazeta Médica da Bahia (ISSN 0016-545X).

Todos os direitos reservados.

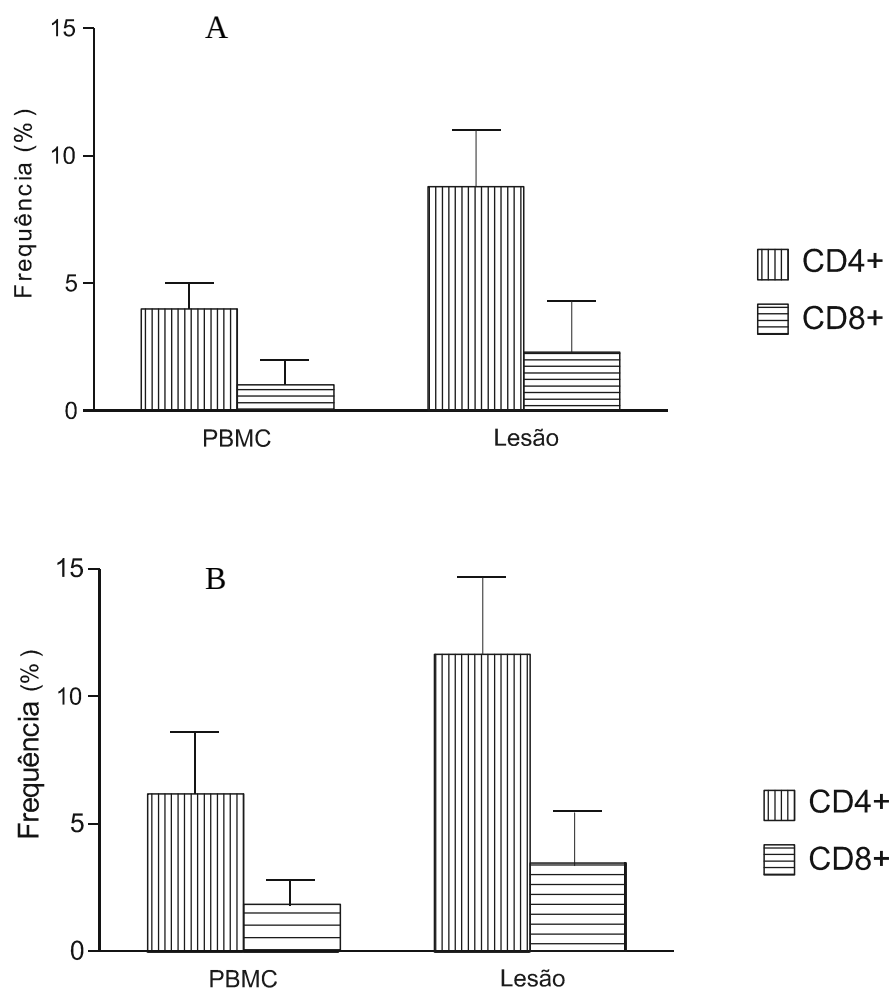
produção de IL-4 e IL-5, observada em camundongos BALB/c, está associada à susceptibilidade à infecção e proliferação do parasita^(28,29). No homem, também o controle da infecção contra a leishmania é mediado por células. No entanto, os estudos que serão aqui revistos e mostrados revelam que a resposta imune na leishmaniose é complexa. Enquanto que a deficiência da resposta imune protetora está relacionada com a multiplicação do parasita, uma forte resposta tipo 1 pode também estar associada com a lesão tecidual. Nesse contexto, à semelhança da hanseníase, a LTA apresenta formas polares da doença. Na leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa, existe uma forte resposta tipo 1, o que controla a multiplicação do parasita, porém há lesão tecidual⁽²⁵⁾. Enquanto que, na leishmaniose disseminada e na leishmaniose cutânea difusa, a diminuição ou ausência de resposta tipo 1 favorece a multiplicação e disseminação da leishmania^(10,34). A exemplo do que ocorre em outras doenças infecciosas e parasitárias, o estudo da resposta imune em indivíduos que montam resposta à infecção e não desenvolvem a doença aparente consiste em uma boa forma de entender os mecanismos imunológicos de proteção contra a infecção. Follador et al.⁽¹⁹⁾, comparando a resposta imune de indivíduos sem história de doença e com teste cutâneo de hipersensibilidade tardia positivo a antígeno de leishmania (infecção sub-clínica) com a resposta de indivíduos com leishmaniose cutânea, demonstraram que esses indivíduos tem uma resposta tipo 1 em níveis bem menores do que aqueles com leishmaniose cutânea, sugerindo que a resposta tipo 1 modulada com concentrações menores de IFN- γ pode ser suficiente para a proteção contra o parasita sem induzir à inflamação tecidual.

Imunopatogênese da Leishmaniose Cutânea

Pacientes com leishmaniose cutânea apresentam, na maioria das vezes, uma ou mais lesões ulceradas de fundo granuloso e bordas elevadas. A análise histopatológica da lesão mostra infiltrado mononuclear nas lesões desses pacientes⁽⁸⁾. Pacientes com

leishmaniose cutânea apresentam teste intradérmico de Montenegro positivo e alta resposta linfoproliferativa para antígeno solúvel de leishmania (SLA). Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com leishmaniose cutânea secretam altos níveis de IFN- γ e TNF- α e baixos níveis de IL-5 e IL-10 quando estimuladas com SLA⁽⁵⁾, sendo a célula CD4+ o tipo celular que contribui com a maior parte da produção de IFN- γ tanto no sangue periférico quanto a nível tecidual, embora haja participação de células CD8+ na produção dessa citocina⁽²⁾ (Figura 1A, 1B). Na lesão de pacientes com leishmaniose cutânea, é observada uma predominância de RNA mensageiro de citocinas tipo 1 como a IL-2, IFN- γ e TNF- α ⁽²⁴⁾. Da-Cruz et al.⁽¹⁶⁾ mostraram que a razão de células CD4/CD8 é maior em indivíduos com doença ativa e que o número dessas células tende a se igualar após terapêutica com antimonial pentavalente, sendo sugerido um papel da célula CD8+ na cura da lesão. No entanto, evidências de que a resposta inflamatória é responsável pelo aparecimento da úlcera na leishmaniose cutânea tem sido acumulada: 1) o tratamento de pacientes com lesão inicial não previne o aparecimento de úlcera⁽²²⁾; 2) as concentrações de IFN- γ e TNF- α diminuem após tratamento⁽²⁵⁾; 3) indivíduos com teste de Montenegro positivo, que não desenvolvem lesão (forma subclínica da infecção por *L. braziliensis*), apresentam níveis mais baixos de IFN- γ e TNF- α do que pacientes com leishmaniose cutânea⁽¹⁹⁾. Machado et al.⁽¹⁰⁾ demonstraram não só que o tratamento precoce da leishmaniose cutânea (< 20 dias de lesão) não previne o crescimento da úlcera cutânea, como também nessa situação cerca de 50% dos pacientes apresentam pior resposta ao tratamento, além de demonstrar a presença de vasculite e marcador de citotoxicidade (Tia-1) nessas lesões iniciais^(22,23). Esses dados sugerem que a resposta inflamatória é importante para o desenvolvimento da úlcera. A razão pela qual, apesar de haver uma forte resposta tipo 1, mas não existir uma completa destruição de parasitas, não é completamente entendida. Em modelo experimental, por exemplo, foi demonstrado o papel de células T regulatórias CD4+CD25+ produtoras de IL-10 na persistência do parasita, no local da infecção,

Figura 1. Frequência de células CD4⁺ ou CD8⁺ positivas para IFN- γ . Células foram isoladas de sangue periférico ou extraídas de lesão de pacientes com leishmaniose cutânea (A) e leishmaniose mucosa (B), estimuladas com SLA (10 μ g/mL). A frequência de células positivas para IFN- γ foi determinada por citometria de fluxo.



com cura da lesão⁽⁷⁾. Esse poderia ser um mecanismo evolutivo de adaptação do parasita ao hospedeiro mamífero, uma vez que favorece a persistência sem produzir lesão, ao mesmo tempo em que essa persistência protege o hospedeiro da reinfecção. De fato, alguns componentes antigênicos do parasito são capazes de induzir a uma resposta imune diferenciada, não só no tipo de resposta imunológica observada nesses pacientes, como também no tipo de célula ativada. Alguns antígenos recombinantes de leishmania

induzem resposta tipo 1 enquanto outros induzem resposta regulatória. O H2A e o H3 induzem, principalmente, produção de IFN- γ em células de indivíduos com leishmaniose cutânea⁽¹⁸⁾. O LeIF induz à produção de IL-12^(32,33). O LACK e o KMP11 induzem, principalmente, à secreção de IL-10, que regula negativamente a resposta imune. A tentativa de modular a produção de IFN- γ desses pacientes em resposta ao SLA foi feita com a adição desses antígenos, sendo observado que tanto o LACK como

o KMP11 são capazes de suprimir a produção de IFN- γ *in vitro* induzida por SLA nesses pacientes (Figura 2)^(11,15). A principal célula ativada por LACK ou KMP11 é o macrófago; porém, a célula T CD8+ também produz IL-10 após estimulação *in vitro* com esses antígenos⁽¹⁵⁾. Além disso, a neutralização *in vitro* de citocinas envolvidas na ativação e proliferação celular (IL-2 e IL-15) é também capaz de suprimir a produção de IFN- γ induzida por SLA nesses pacientes. Tem sido mostrado que, nas formas iniciais da leishmaniose cutânea, pode ser observada a produção de citocinas tipo 2 no tecido e uma modulação da resposta tipo 1 mediada por IL-10⁽²⁶⁾. Todavia, essas alterações são transitórias e, com a evolução da doença, uma intensa resposta inflamatória mediada por IFN- γ e TNF- α é observada.

Imunopatogênese da Leishmaniose Mucosa

A leishmaniose mucosa é uma das formas mais agressivas de leishmaniose tegumentar. A doença acomete principalmente a mucosa nasal, mas pode haver também envolvimento do palato, faringe e laringe. A importância da leishmaniose mucosa é devida não só ao intenso processo inflamatório que acompanha a doença, levando à destruição do septo nasal e aparecimento de lesões desfigurantes, mas também pelo alto índice de refratariedade ao tratamento com antimonial. Assim como na leishmaniose cutânea, o papel da resposta imune na patogênese da leishmaniose mucosa é bem caracterizado. As CMSP de pacientes com leishmaniose mucosa secretam concentrações ainda mais elevadas de IFN- γ e TNF- α quando estimuladas com SLA do que as observadas nos pacientes com leishmaniose cutânea. A célula CD4+ é responsável pela maior parte da produção de IFN- γ , tanto em sangue periférico como no tecido lesado dos pacientes com leishmaniose mucosa (Figura 1). Os linfócitos também representam cerca de 60 a 90% das células produtoras de TNF- α , seguidos por macrófagos⁽⁵⁾. Além disso, essa resposta inflamatória exacerbada não é devidamente modulada, já que as CMSP desses pacientes secretam baixos níveis de IL-

10 quando estimuladas com SLA. Além disso, diferente dos pacientes com leishmaniose cutânea, a adição de IL-10 exógena ou de antígenos recombinantes que induzem à produção de IL-10 em culturas de células mononucleares estimuladas com SLA, não é capaz de modular a produção de IFN- γ em pacientes com leishmaniose mucosa (Figura 2). Outro aspecto importante é que a neutralização *in vitro* de citocinas envolvidas na ativação ou proliferação celular (IL-2, IL-12 e IL-15) não tem efeito significativo na modulação da produção de IFN- γ de pacientes com leishmaniose mucosa (Figura 3). Contribui também para essa intensa resposta tipo 1 o fato de que pacientes com leishmaniose mucosa apresentam um maior número de células T CD4+ ativadas (CD4+CD28-, CD4+CD62L-, CD4+CD69+) do que pacientes com leishmaniose cutânea, o que explica também a incapacidade de modulação da resposta observada nesses pacientes. A nível tecidual, a resposta imunológica observada em pacientes com leishmaniose mucosa difere daquela encontrada no sangue periférico. Na lesão de pacientes com leishmaniose mucosa, observou-se RNA mensageiro tanto para citocinas do tipo 1, quanto do tipo 2⁽²⁴⁾. É possível que a produção tecidual de citocinas Th2 seja uma tentativa de modular uma intensa resposta Th1. O papel do TNF- α na patogênese da leishmaniose mucosa é sugerido pelo fato de que pacientes com leishmaniose mucosa apresentam grandes quantidades da forma solúvel de TNF- α biologicamente ativo e deletério⁽¹⁷⁾. Além dos estudos imunológicos, ensaios clínicos com ênfase na inibição de citocinas como o TNF- α têm contribuído para o entendimento da imunopatogênese na leishmaniose mucosa. O tratamento da leishmaniose com inibidor de TNF- α (pentoxifilina), associado ao antimonial pentavalente, diminui o tempo de cura de pacientes virgens de tratamento e é eficaz no tratamento de indivíduos refratários ao antimonial⁽²¹⁾.

Imunopatogênese da Leishmaniose Disseminada

A leishmaniose disseminada é uma forma de leishmaniose emergente no Nordeste do Brasil,

Figura 2. Efeito da adição de KMP11 ou LACK na produção de IFN- γ em culturas de PBMC de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM) estimuladas com SLA (10 μ g/mL).

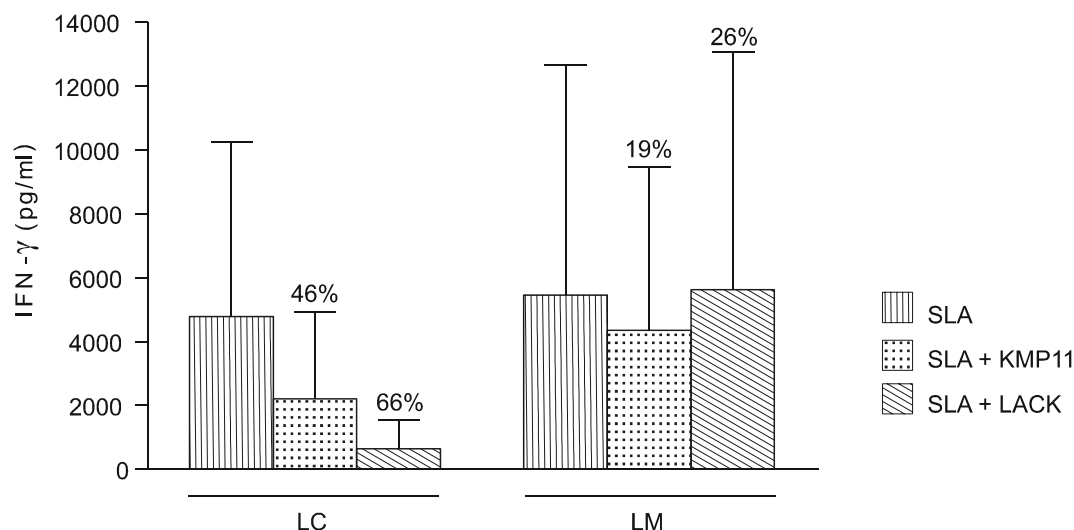
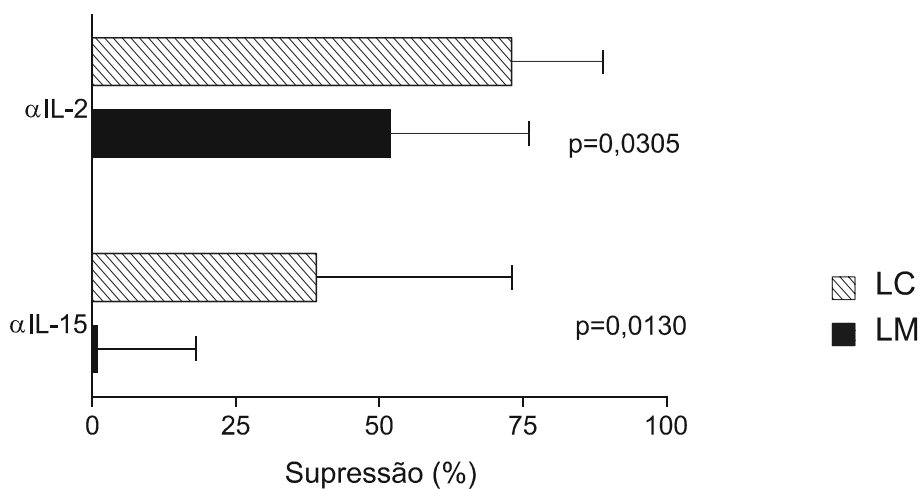


Figura 3. Efeito da neutralização de IL-2 ou IL-15 na produção de IFN- γ em culturas de PBMC de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM) estimuladas com SLA (10 μ g/mL).



causada, na maioria das vezes, por *L. braziliensis*. Pacientes com leishmaniose disseminada apresentam múltiplas lesões em mais de uma parte do corpo. Essas lesões podem ser acneiformes nodulares ou ulceradas. Os pacientes habitualmente apresentam uma lesão, seguida de uma história de febre com aparecimento

de múltiplas lesões distribuídas em todo o corpo, num quadro que sugere disseminação hematogênica. O acometimento da mucosa nasal aparece com mais frequência em indivíduos com leishmaniose disseminada. Alguns estudos prévios confundiam a leishmaniose disseminada com leishmaniose cutânea

difusa, descrevendo as alterações imunológicas desses pacientes como as encontradas na leishmaniose cutânea difusa, (ausência de resposta tipo 1 com alta expressão de IL-10). Mais recentemente, a leishmaniose disseminada foi clinicamente e imunologicamente diferenciada da forma difusa. Do ponto de vista histopatológico, é observado infiltrado mononuclear com presença de linfócitos e macrófagos e poucos parasitas⁽¹³⁾. Indivíduos com leishmaniose disseminada podem ter o teste de Montenegro positivo ou negativo e têm baixa resposta linfoproliferativa ao SLA⁽¹³⁾. Na leishmaniose disseminada, há uma produção de IFN- γ e TNF- α por células mononucleares após estímulo com SLA, porém, quando comparada às encontradas na leishmaniose cutânea, essas concentrações são mais baixas e, quando comparada às encontradas na leishmaniose cutânea difusa, essas concentrações são bem mais elevadas. A avaliação de 8 pacientes com leishmaniose disseminada demonstrou diminuição de contagem de células CD4+ em 4 deles, sendo que em 2 deles falha terapêutica foi observada⁽¹³⁾. A diminuição de resposta tipo 1 em pacientes com leishmaniose disseminada favorece a multiplicação e predispõe à disseminação da doença. No entanto, a presença de uma resposta tipo 1 favorece o controle da multiplicação dos parasitas nas lesões, sendo essa forma clínica intermediária entre a leishmaniose cutânea e a leishmaniose cutânea difusa.

Imunopatogênese da Leishmaniose Cutânea Difusa

A leishmaniose cutânea difusa é uma forma clínica rara de leishmaniose, tendo como agente causal no Brasil a *L. amazonensis*. A ausência de resposta ao tratamento ou recidiva após a terapêutica é um achado comum nos pacientes portadores dessa enfermidade. As lesões de pacientes com leishmaniose cutânea difusa são, na sua maioria, nodulares, em grande número, e disseminadas ao longo do corpo. Existe a presença de macrófagos parasitados^(9,12). Imunologicamente, a leishmaniose cutânea difusa tem aspectos semelhantes à leishmaniose visceral. Pacientes

com leishmaniose cutânea difusa apresentam negatividade do teste de Montenegro, baixa ou ausência de resposta linfoproliferativa e baixa ou ausência de produção de IFN- γ para antígeno de leishmania. A avaliação da expressão de RNA mensageiro para citocinas demonstrou que células mononucleares de pacientes com leishmaniose cutânea difusa expressam grandes quantidades de IL-10 e IL-4 e baixas quantidades de IFN- γ durante a fase ativa da doença. Após a terapêutica e atenuação das lesões, a expressão de IL-10 diminui enquanto que a expressão de IFN- γ aumenta⁽¹⁰⁾. Concentrações elevadas de IL-10 foram encontradas em sobrenadantes de culturas de CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea difusa, estimuladas com antígeno de leishmania. Esses dados mostram que a principal deficiência imunológica na leishmaniose cutânea difusa é a incapacidade de produção de IFN- γ e que a IL-10 tem papel importante nessa modulação negativa.

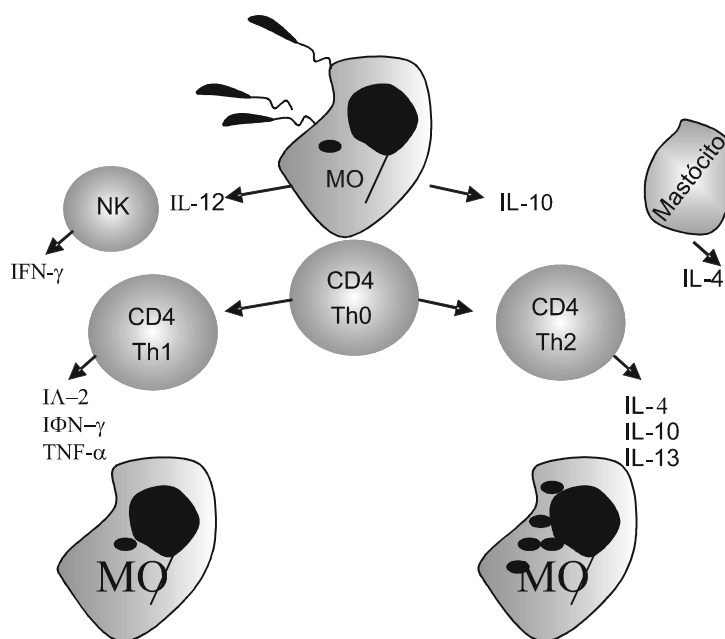
Discussão

A importância da resposta imune na patogênese das doenças tem sido evidenciada em várias enfermidades infecciosas, entre as quais, hanseníase, tuberculose, esquistossomose e candidíase^(3,4,14,20). Na leishmaniose, estudos experimentais e no homem têm demonstrando que a produção de IFN- γ é fundamental para o controle da infecção. A avaliação da resposta imune e os achados histopatológicos observados nos indivíduos com leishmaniose cutânea difusa corroboram com os dados em modelos experimentais, mostrando que a resposta Th1 é fundamental para a ativação de macrófagos e síntese de produtos que são tóxicos para a leishmania como o peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico. Nesse caso, a presença de grandes quantidades de citocinas regulatórias e a ausência ou diminuição da concentração de IFN- γ contribuem para a disseminação do parasito⁽⁶⁾. Por outro lado, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como os observados na leishmaniose cutânea e na leishmaniose mucosa, são responsáveis por ativação macrofágica e destruição da leishmania, mas também podem

contribuir para o dano tecidual observado^(5,15,25). As principais evidências de que a resposta imune tipo 1 está associada com a lesão tecidual na leishmaniose cutânea e na leishmaniose mucosa são: 1) desproporção entre o número de parasitas e lesão tecidual; 2) incapacidade do tratamento com antimonial na fase pré-ulcerativa no intuito de prevenir o aparecimento de úlcera⁽²²⁾; 3) capacidade de moléculas como o GM-CSF e a pentoxifilina em reduzir o tempo de cura de pacientes com leishmaniose cutânea e pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa^(1,21). Outro aspecto importante é a observação

de que indivíduos residentes em área de transmissão de *L. braziliensis* que apresentam sorologia e teste de Montenegro positivo, mas não desenvolvem doença, têm um tipo de resposta imune não polarizada (tipo 1 e tipo 2). Esses indivíduos com infecção subclínica por *L. braziliensis* têm uma resposta imune modulada, a qual é capaz de controlar a multiplicação parasitária e não causar danos ao hospedeiro⁽¹⁹⁾. O Diagrama 1 propõe um modelo de imunopatogênese da leishmaniose tegumentar. Não estão ainda esclarecidos fatores do hospedeiro que influenciem na resposta imune e que possam estar contribuindo para o espectro

Diagrama 1. Modelo esquemático do efeito da diferenciação Th1 e Th2 e produção de citocinas na leishmaniose tegumentar americana. LC, leishmaniose cutânea; LM, leishmaniose mucosa; LD, leishmaniose disseminada; LCD, leishmaniose cutânea difusa.



	Resposta tipo 1	Treg	Resposta tipo 2	Consequência
LC	++++	++	+	Lesão tecidual mediada por citocinas pro-inflamatórias
LM	+++++	-	+/-	Lesão tecidual mediada por citocinas pro-inflamatórias
LD	+++	+++	++	Disseminação c/ controle da multiplicação do parasito
LCD	-	+++	++++	Multiplicação e disseminação do parasito

clínico diverso das leishmanioses. Recentemente, tem sido demonstrada a influência de polimorfismos genéticos em genes que regulam a resposta imune na magnitude da resposta imune. É possível que esses polimorfismos expliquem variações nas respostas dos indivíduos ao parasita, resultando em uma resposta imune diferenciada e conseqüente diversidade de formas clínicas. Por outro lado, o parasita deve também exercer um papel importante na resposta imune e contribuir para a exacerbação da doença, como vem sendo demonstrado em alguns estudos. Estes mostram a associação entre formas diversas de leishmaniose e espécies ou mesmo entre parasitas da mesma espécie com diferenças genéticas ⁽²⁷⁾.

Referências Bibliográficas

1. Almeida R, D'Oliveira Jr A, Machado P, Bacellar O, Ko AI, de Jesus AR, Mobashery N, Brito Santos J, Carvalho EM. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 180: 1735-1737, 1999.
2. Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clinical Experimental Immunology* 136: 341-348, 2004.
3. Araujo MI, de Jesus AR, Bacellar O, Sabin E, Pearce E, Carvalho EM. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *European Journal of Immunology* 26: 1399-1403, 1996.
4. Arruda S, Chalhoub M, Cardoso S, Barral-Netto M. Cell-mediated immune responses and cytotoxicity to mycobacterial antigens in patients with tuberculous pleurisy in Brazil. *Acta Tropica* 71: 1-15, 1998.
5. Bacellar O, Lessa H, Schrieffer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection & Immunity* 70: 6734-6740, 2002.
6. Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *International Journal of Dermatology* 34: 474-479, 1995.
7. Belkaid Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in Leishmania infection. *Expert Opinion on Biological Therapy* 3: 875-885, 2003.
8. Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86: 51-56, 1991.
9. Bittencourt AL, de Freitas LA, Pompeu ML, Vieira ML, Barral A. Distinct ultrastructural aspects in different biopsies of a single patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 85: 53-59, 1990.
10. Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 84: 188-194, 1996.
11. Bottrel RL, Dutra WO, Martins FA, Gontijo B, Carvalho E, Barral-Netto M, Barral A, Almeida RP, Mayrink W, Locksley R, Gollob KJ. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble Leishmania antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infection & Immunity* 69: 3232-3239, 2001.
12. Bryceson AD. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. 3. Immunological studies. IV. Pathogenesis of diffuse cutaneous leishmaniasis. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 64: 380-393, 1970.
13. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 56: 315-325, 1994.
14. Carvalho LP, Bacellar O, Neves N, de Jesus AR, Carvalho EM. Downregulation of IFN-gamma production in patients with recurrent vaginal candidiasis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109: 102-105, 2002.
15. Carvalho LP, Passos S, Dutra WO, Soto M, Alonso C, Gollob KJ, Carvalho EM, Ribeiro de Jesus A. Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scandinavian Journal of Immunology* 61: 337-342, 2005.
16. Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 9: 251-256, 2002.
17. Da-Cruz AM, de Oliveira MP, De Luca PM, Mendonça SC, Coutinho SG. Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91: 225-229, 1996.

18. de Carvalho LP, Soto M, Jeronimo S, Dondji B, Bacellar O, Luz V, Orge Orge G, Alonso C, Jesus AR, Carvalho EM. Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes & Infection* 5: 7-12, 2003.
19. Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araujo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clinical Infectious Diseases* 34: E54-58, 2002.
20. Kaplan G, Cohn ZA. Leprosy and cell-mediated immunity. *Current Opinion on Immunology* 3: 91-96, 1991.
21. Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho EM. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65: 87-89, 2001.
22. Machado P, Araujo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Bittencourt A, Carvalho EM. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clinical Infectious Diseases* 34: E69-73, 2002.
23. Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araujo C, Carvalho EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Dermatology* 12: 449-451, 2002.
24. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *Journal of Clinical Investigation* 91: 1390-1395, 1993.
25. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 31: 143-148, 1998.
26. Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, de Jesus AR, Filho DC, Filho AC, Barral A, Coffman RL, Carvalho EM. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 180: 1731-1734, 1999.
27. Schriefer A, Schriefer AL, Goes-Neto A, Guimaraes LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infection and Immunity* 72: 508-514, 2004.
28. Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *Journal of Experimental Medicine* 168: 1675-1684, 1988.
29. Scott P, Pearce E, Cheever AW, Coffman RL, Sher A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunology Review* 112: 161-182, 1989.
30. Scott P, Sacks D, Sher A. Resistance to macrophage-mediated killing as a factor influencing the pathogenesis of chronic cutaneous leishmaniasis. *Journal of Immunology* 131: 966-971, 1983.
31. Sher A, Sacks DL, Scott PA. Host and parasite factors influencing the expression of cutaneous leishmaniasis. *Ciba Foundation Symposium* 99: 174-189, 1983.
32. Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, Bacellar O, Carvalho EM, Kubin M, Badaro R, Trinchieri G, Reed SG. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *Journal of Experimental Medicine* 181: 1527-1537, 1995.
33. Skeiky YA, Kennedy M, Kaufman D, Borges MM, Guderian JA, Scholler JK, Ovendale PJ, Picha KS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Campos-Neto A, Reed SG. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *Journal of Immunology* 161: 6171-6179, 1998.
34. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD, Jr., Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *Journal of Infectious Diseases* 186: 1829-1834, 2002.

Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar

Clinical Aspects of Tegumentary Leishmaniasis

Luiz Henrique Guimarães, Paulo Roberto L. Machado, Hélio A. Lessa,
Marcus Lessa, Argemiro D'Oliveira Jr, Edgar M. Carvalho

*Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Faculdade de Medicina da Bahia da
Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil*

A leishmaniose tegumentar representa um grupo de doenças com características clínicas, imunológicas e patológicas distintas, compondo uma manifestação espectral. Diversos fatores interferem nessas diferenças, com destaque para a resposta imune do hospedeiro e fatores inerentes à leishmania, que podem aumentar ou atenuar o seu poder patogênico. Recentemente, tem sido demonstrado que a saliva do vetor (*Lutzomyia*) facilita a infecção em modelos experimentais, porém essa influência ainda não está bem estudada no ser humano. Na Bahia, o principal agente da leishmaniose tegumentar é a *Leishmania braziliensis*, seguido da *Leishmania amazonensis*, que é identificada em poucos casos. As quatro principais formas clínicas da doença descritas são: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa, leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose disseminada. A leishmaniose cutânea é a forma mais comum, caracterizando-se pela presença de uma ou várias úlceras com predileção por áreas expostas, principalmente membros inferiores. A leishmaniose mucosa ocorre concomitantemente ou anos após quadro de leishmaniose cutânea em cerca de 3% dos casos e pode progredir para intensa destruição tecidual da mucosa nasal, tornando-se doença grave. A forma difusa é muito rara na Bahia, com presença de nódulos e lesões infiltradas de maneira difusa pelo tegumento, em pacientes anérgicos a antígenos de leishmania. A leishmaniose disseminada apresenta inúmeras lesões acneiformes, papulosas e ulceradas que surgem abruptamente, muitas vezes associadas a sintomas como calafrios e astenia, sugerindo disseminação hematogênica do parasita. Na área endêmica de Corte de Pedra/BA, descreve-se um aumento desta última nos últimos anos, sem associação com imunossupressão.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa, leishmaniose disseminada, leishmaniose difusa.

Tegumentary leishmaniasis is a group of diseases of different clinical, immunological and pathological aspects that comprise a wide spectrum of manifestations. Several factors may be responsible for this clinical variability, principally the host immune response, but also factors that may increase or attenuate the pathogenic role of the leishmania. Recent research has shown that the saliva of the vector (Lutzomyia) may promote the development of the Leishmania infection in experimental models. However, this effect has not been documented in cases of the disease in humans. In Bahia, Leishmania braziliensis is the major causal agent of tegumentary leishmaniasis, with only a few cases being caused by Leishmania amazonensis. Four different forms of the disease are described: cutaneous leishmaniasis, mucosal leishmaniasis, diffuse cutaneous leishmaniasis and disseminated leishmaniasis. Cutaneous leishmaniasis is the most common clinical manifestation, characterized by one or several ulcerations in exposed areas, mainly in the lower limbs. Mucosal leishmaniasis occurs concomitantly or following cutaneous leishmaniasis in 3% of the cases, and may result in severe tissue damage. The diffuse form of leishmaniasis is rare in

Recebido em 22/02/2005

Aceito em 27/05/2005

Endereço para correspondência: Dr. Edgar M. Carvalho, Serviço de Imunologia, 5º andar, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n Canela, 40110-160, Salvador, BA, Brasil. Tel.: 55 71 3237-7353; Fax: 55 71 3245-7110. E-mail: imuno@ufba.br

Bahia and is characterized by nodules and infiltrative lesions all over the body in patients who are anergic to leishmania antigens. Disseminated leishmaniasis has an abrupt onset associated with chills and asthenia, suggesting the haematogenous dissemination of the parasite from a primary lesion. Patients show a great number of acneiform, papular and ulcerated lesions. In recent years, an increase in the number of cases of disseminated leishmaniasis unrelated to immunosuppression has been described in the endemic area of Corte de Pedra in the state of Bahia, Brazil.

Key words: Cutaneous leishmaniasis, mucosal leishmaniasis, diffuse cutaneous leishmaniasis and disseminated leishmaniasis.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) representa um conjunto de doenças com características clínicas imunológicas e patológicas distintas, cuja expressão depende de fatores relacionados ao hospedeiro e ao parasita. Recentemente, ênfase tem sido dada ao papel do vetor, mais especificamente da saliva do flebótomo na progressão da infecção causada pela leishmania em modelos experimentais, mas a influência do vetor nas manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar ainda não tem sido estudada.

Mais de uma dezena de espécies de *Leishmania* são capazes de causar a leishmaniose tegumentar no Velho e no Novo Mundo; mas, no Brasil, os principais agentes causais da LTA são a *L. Viannia braziliensis*, a *L. Viannia guyanensis* e a *L. Leishmania amazonensis*, apresentando quatro formas clínicas bem reconhecidas: a leishmaniose cutânea, a leishmaniose mucosa, a leishmaniose cutânea difusa e a leishmaniose disseminada. Enquanto a infecção por *L. amazonensis* na região Amazônica normalmente se associa com lesão única e cicatrização espontânea⁽²⁰⁾, a *L. braziliensis* é responsável pelas formas mais graves da doença, incluindo a forma mucosa^(12,22), com exceção da forma anérgica difusa, cujo único agente descrito em nosso país é a *L. amazonensis*^(2,12).

A leishmaniose cutânea clássica representa cerca de 90 a 95% dos casos de LTA. Caracteriza-se, clinicamente, por lesão (ões) ulcerada(s), de bordas elevadas com um fundo geralmente granuloso. Em área de transmissão de *L. braziliensis*, a doença acomete, predominantemente, os membros inferiores em adultos do sexo masculino⁽¹¹⁾. Contudo, está surgindo cada vez um maior número de casos com lesão em tórax, face e membros superiores; fato que vem sendo associado com uma mudança no padrão de transmissão,

que ocorria na zona rural e passou a ocorrer nas áreas peri-domiciliares ou intradomiciliares⁽¹⁶⁾.

A forma cutânea localizada corresponde a 97,3% dos casos de leishmaniose tegumentar observados na região endêmica de Três Braços/BA, onde a *L. braziliensis* é responsável por mais de 90% dos casos⁽¹¹⁾. Um estudo prospectivo nesta região mostrou que em 74% dos pacientes a doença manifestou-se com ulceração clássica e única, enquanto em 26% havia presença de duas ou mais lesões. Nesses pacientes, a localização mais comum das lesões foi nos membros inferiores (73%), seguida de membros superiores (11%), tronco (10%), cabeça e pescoço (5%) e nariz (1%)⁽¹¹⁾.

A lesão cutânea se instala no sítio de entrada do parasita após período de incubação estimado entre 2 semanas e alguns meses⁽²²⁾. Na infecção causada pela *L. Viannia braziliensis* a fase inicial da doença se caracteriza por uma pápula ou nódulo seguido de ulceração superficial, habitualmente acompanhada de exuberante adenomegalia regional indolor maior do que 3 cm, documentada em 85% dos casos⁽¹⁵⁾. Em um estudo no qual uma busca ativa de casos em fase inicial da doença foi feita em familiares de pacientes com leishmaniose cutânea, Barral et al.⁽⁴⁾ relatam o isolamento de *L. braziliensis* no linfonodo de 10 pacientes na região endêmica de Corte de Pedra/BA, onde a linfadenopatia sem lesão cutânea foi detectada, com 7 desses pacientes evoluindo com ulceração cutânea posteriormente. Como a maioria das lesões cutâneas ocorre em membros inferiores, a linfadenopatia crural é a predominantemente observada⁽⁴⁾. É compreensível que gânglios próximos ao sítio de inoculação do parasita devem ter um papel importante no controle do processo infeccioso. Em camundongos

resistentes à doença, a excisão da cadeia linfática homolateral ao sítio da infecção induz ao rápido aparecimento de lesões metastáticas ⁽¹⁷⁾. Por outro lado, uma resposta imune exuberante e não modulada contra o agente parasitário pode estar envolvida no fenômeno patológico responsável pelo desenvolvimento de lesões cutâneas ou mucosas na LTA ^(1,18). Portanto, é bastante provável que a intensa linfadenopatia regional que ocorre nesses pacientes, além de contribuir para a eliminação do parasita, esteja associada ao processo que resulta em dano tecidual. A comparação de subgrupos de pacientes com a forma recente de leishmaniose cutânea, que desenvolvem ulceração, apesar de tratamento precoce, e necessitam de segunda série para cura, em contraste com o subgrupo que evoluiu com cura rápida usando uma série de antimonial, mostrou ausência de adenopatia regional em apenas 4 indivíduos, todos pertencentes ao subgrupo com evolução favorável ⁽¹⁵⁾. Desta forma, estudos são necessários no sentido de determinar se esta exuberante linfadenopatia se relaciona com a proteção ou com a patologia. Na maioria dos casos de LTA, a lesão cutânea inicial evolui para ulceração superficial e, posteriormente, para a lesão clássica de úlcera profunda bem delimitada com bordas elevadas, que habitualmente atingem pleno desenvolvimento em 60 a 90 dias de doença. Mais raramente são observadas lesões vegetantes, lesões verrucosas, lesões superficiais eritemato-descamativas, lesões em placa e infiltradas também denominadas de lupóides e lesões nodulares, seguindo um trajeto linfático como o observado na esporotricose ⁽²²⁾.

Do ponto de vista histopatológico, a leishmaniose cutânea se caracteriza por um infiltrado linfoplasmocitário, presença de granuloma e ausência ou escassez de parasitas. Entretanto, uma biópsia realizada na fase inicial da doença e antes do aparecimento de ulceração clássica apresentam uma vasculite linfoplasmocitária obliterando parcialmente ou completamente a luz do vaso. Dessa forma, é possível que esta resposta inflamatória do hospedeiro a nível da luz do vaso tenha um papel importante no desenvolvimento da úlcera e, conseqüentemente, na patogênese da doença.

O método ideal para diagnóstico de uma doença infecciosa é a identificação de parasitas. Todavia, como anteriormente mencionado, o parasita é escasso na lesão e, mesmo através da cultura, o percentual de positividade é baixo para ser considerado como um método indispensável para o diagnóstico. Como o teste intradérmico de hipersensibilidade tardia tem sensibilidade que se aproxima de 100% no diagnóstico da leishmaniose cutânea, em uma área endêmica, é plenamente aceitável que o diagnóstico da doença seja feito baseado na presença de uma lesão típica associada ao teste intradérmico (reação de Montenegro) positivo. Fora da área endêmica, são recomendados o estudo histopatológico, a realização de cultura do parasita e a utilização de técnicas como a deração de polimerase em cadeia (PCR).

O aspecto clínico da leishmaniose tegumentar no Brasil e a resposta imune nas formas clínicas de LTA são mostrados na Figura 1.

Os pólos da doença são representados pela leishmaniose mucosa, caracterizada por uma resposta imune exacerbada contra o parasita, mas também associada à lesão tecidual; e, no outro extremo, pela leishmaniose cutânea difusa, caracterizada por incapacidade de produção de INF- γ , principal citocina ativadora de macrófago e de indução nesta célula da síntese de óxido nítrico e peroxidase de hidrogênio, responsáveis pela morte do parasita.

A leishmaniose cutânea tem características imunológicas semelhantes, mas menos exuberantes que a mucosa, e a leishmaniose disseminada apresenta uma resposta imune celular mais próxima da leishmaniose cutânea difusa. No centro da Figura 1, observa-se a infecção subclínica, na qual existe uma resposta imune modulada que controla a infecção sem levar o parasita à morte.

Estudos na fase inicial da leishmaniose cutânea, antes do aparecimento da lesão ulcerada clássica, podem contribuir para o entendimento da patogênese da doença. Analisando 22 de indivíduos nesta fase precoce de doença, Machado *et al.* ⁽¹⁵⁾ mostraram que a instituição da terapêutica precoce

Figura 1. Espectro clínico e imunológico da leishmaniose tegumentar.

Leishmaniose mucosa (LM)



Leishmaniose cutânea (LC)

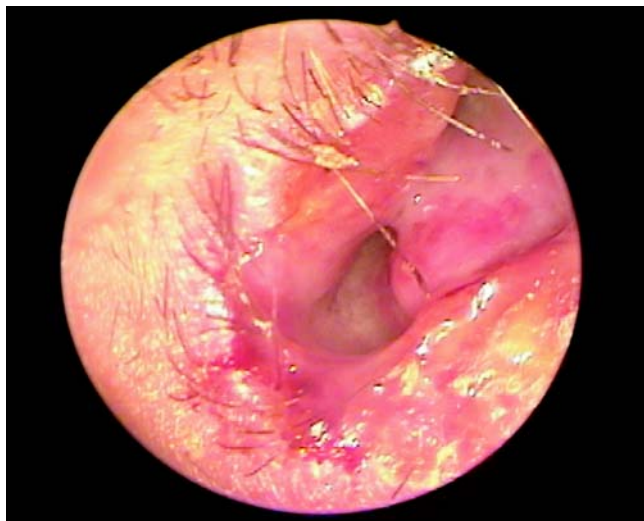
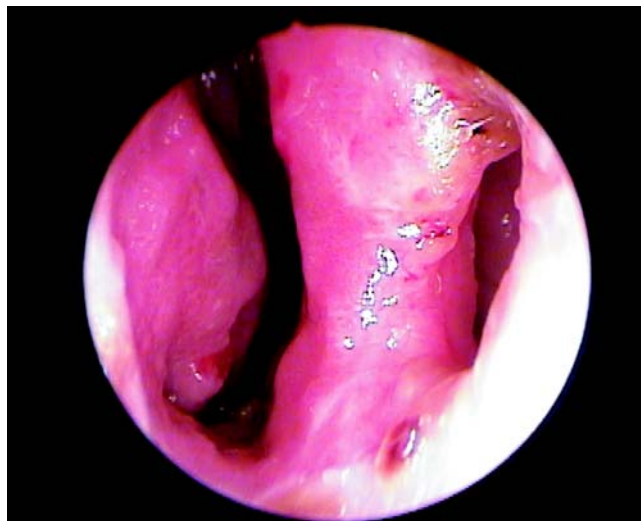


Leishmaniose disseminada (LD)



Leishmaniose cutânea difusa (LCI)

	<i>Pólo hiperérgico</i> +		Infecção subclínica ↓	<i>Pólo anérgico</i> -	
	LM	LC		LD	LCI
Parasitas	+/-	+	?	+ / ++	++++
Im.celular	+++	++	+	+ / -	-

Figura 2a. Estágio III da leishmaniose mucosa, mostrando granulação aberrante, com alargamento do septo nasal e tendência à formação de sinéquia.**Figura 2b.** Estágio IV da leishmaniose mucosa. Presença de granulação com perfuração do septo nasal.

com antimonial não interferiu na evolução da doença em 10 dos casos. Ou seja, a despeito do tratamento, os pacientes evoluíram com o aparecimento de úlceras.

Cerca de 2,7% dos pacientes infectados com *L. braziliensis*, na área endêmica de Corte de Pedra/BA, evoluíram para doença mucosa concomitantemente ou meses e até anos após a cura da doença cutânea ⁽¹¹⁾. Os fatores de risco para desenvolvimento de lesão mucosa são a presença de lesões múltiplas ou extensas, lesões acima da cintura e tratamento inadequado da lesão cutânea primária ⁽¹³⁾. Com referência ao parasita, tem sido documentada a existência de diferenças genéticas de isolados de *L. braziliensis* e que essas diferenças podem se relacionar com as diferentes formas clínicas da doença ⁽¹⁹⁾. Por parte do hospedeiro, existe uma agregação familiar dos casos de leishmaniose mucosa, o que pode relacionar-se tanto com o ambiente como pela genética do hospedeiro. Dá suporte à importância do hospedeiro no desenvolvimento da doença mucosa a observação de que, nesses casos da doença, existe uma resposta imune exagerada caracterizada por grande produção de IFN- γ e TNF- α , que, embora envolvidos com a proteção, também estão envolvidos na lesão tecidual ⁽¹⁾.

Clinicamente, a doença mucosa se caracteriza por coriza, obstrução nasal e, em situações mais avançadas, presença de odor fétido. A leishmaniose mucosa acomete o nariz em cerca de 100% dos casos. As lesões atingem o septo cartilaginoso nasal e podem se estender para a parede lateral e assoalho, região do palato, úvula e, em menor frequência, ocorre envolvimento da faringe, laringe, cordas vocais e lábio superior, com graus diversos de infiltração, granulação e ulceração.

A lesão inicial da leishmaniose mucosa é caracterizada por uma nodulação esbranquiçada sem ulceração que é habitualmente observada no septo cartilaginoso (área de Kiesselbach), assoalho e na parede lateral, especificamente na cabeça das conchas inferiores. Este comprometimento, classificado como Estágio I da doença, representa uma fase muito inicial do processo inflamatório e não se assemelha, do ponto de vista clínico, a nenhuma outra doença nasal.

Posteriormente, aparece uma lesão granulosa fina, caracterizada por ulceração superficial, documentada a nível do septo anterior, conchas inferiores e assoalho da fossa nasal (Estágio II). No Estágio III, ou estágio de ulceração profunda, a reação tecidual é mais intensa, com tecido de granulação aberrante e infiltração da mucosa, tornando o septo nasal alargado (Figura 2a). Às vezes, ocorre infiltração edematosa da própria pirâmide nasal. Nessa fase, crostas hemáticas podem ser observadas sobre o septo, conchas inferiores e assoalho das fossas nasais. Essas lesões se caracterizam pela excessiva fragilidade, sangrando com muita facilidade ao toque da mucosa. Clinicamente, o paciente pode queixar-se de sensação dolorosa ao nível da pirâmide nasal, rinorréia de característica sanguinolenta e emissão de crostas hemáticas. Obstrução nasal é um sintoma frequente nessa fase da doença. Do ponto de vista externo, em virtude do processo inflamatório que envolve as cartilagens e o tecido celular subcutâneo e a própria pele da base da pirâmide nasal, o nariz adquire o aspecto conhecido pelo nome de nariz de tapir ou anta.

O Estágio IV da doença caracteriza-se por envolvimento cartilaginoso do septo anterior com necrose e, às vezes, comprometimento da columela. É nesse estágio que se estabelece a perfuração do septo cartilaginoso, também com infiltração acentuada do septo posterior (Figura 2b). Em formas mais avançadas (Estágio V), pode ocorrer destruição total da columela e queda da ponta do nariz, transformando a fossa nasal numa verdadeira cloaca e, às vezes, há perfuração do dorso da pirâmide nasal (Figura 3). Em alguns casos pode ocorrer destruição total do septo anterior, restando ainda a columela inteira, ficando o nariz selado. Crostas extensas de aspecto hemorrágico ou mesmo decorrentes do ressecamento da secreção mucosa provocada pelo alargamento da estrutura nasal interna, podem ser observadas em consequência da lesão tecidual, representada pela destruição do septo cartilaginoso e conchas inferiores. Nesta ocasião, há eliminação de secreção sanguinolenta e a presença de crostas se acentua. A intensidade do processo inflamatório e a conseqüente destruição tecidual podem, portanto, interferir de forma importante na estética

Figura 3. Leishmaniose mucosa, estágio V, com intensa deformidade da pirâmide nasal e desabamento do septo nasal.



facial. Mais raramente, a obstrução de vias aéreas superiores pode se manifestar com dispnéia e ser a causa de óbito ⁽¹⁴⁾.

Diferente das leishmanioses cutânea e mucosa, cuja resposta imune se caracteriza por uma forte resposta do tipo 1 com grande produção de IFN- γ e de TNF- α e importante reação inflamatória com lesão tecidual associada, a leishmaniose cutânea difusa se caracteriza por uma negativação do teste de Montenegro, baixa resposta linfoproliferativa e produção baixa ou ausente de IFN- γ . Em virtude de não apresentar uma resposta imunológica associada com o controle de infecção, os pacientes com leishmaniose cutânea difusa apresentam múltiplas lesões com características nodulares que, ao exame histopatológico, apresentam um infiltrado composto por linfócitos, predominância de macrófagos e documentação fixada de forma amastigota do parasita ⁽⁵⁾.

A leishmaniose cutânea difusa é caracterizada no Brasil pela *L. amazonensis* e é uma forma rara de apresentação da doença. Habitualmente, não existe ulceração das lesões e não há envolvimento da mucosa. Estudos realizados com pacientes diagnosticados no Maranhão têm chamado a

Figura 4. Leishmaniose disseminada. Inúmeras lesões acneiformes, pápulas grandes e eritematosas no tronco.



atenção para uma forma subpolar da doença, na qual pode-se documentar leve resposta inflamatória e ulceração de algumas lesões ⁽³⁾.

O principal defeito imunológico da leishmaniose cutânea difusa é a incapacidade de produção de IFN- γ , principal citocina ativadora de macrófagos. Em contraste, existe um aumento da expressão de IL-10. Durante o tratamento e com conseqüente destruição dos parasitas e melhora de lesões, existe um aumento temporário de IFN- γ e uma redução de IL-10, enfatizando o papel dessas citocinas na resposta imune desta doença ⁽⁶⁾.

Em 1986, Costa et al. ⁽⁸⁾ descrevem, na Bahia, uma forma diferente de leishmaniose, denominada leishmaniose disseminada, por apresentar-se com lesões cutâneas múltiplas em várias partes do corpo. A leishmaniose disseminada se caracteriza pela presença de numerosas lesões papulosas, acneiformes (Figura 4) e menos comumente ulceradas, localizadas na face, tronco e membros com número de lesões variando de 75 até 800 ⁽⁷⁾. Inicialmente, a leishmaniose cutânea disseminada foi associada à *L. amazonensis*, mas, recentemente, quase a totalidade dos casos da doença nessa região é causada pela *L. braziliensis*.

Tabela 1. Achados clínicos, histológicos, parasitológicos e imunopatológicos na LC, LD e LCD.

Aspectos clínicos e imunopatológicos	Formas clínicas de leishmaniose		
	Disseminada	Difusa	LC
Manifestações cutâneas	Lesões papulosas, acneiformes e ulceradas	Nódulos infiltrados	Úlceras
Número de lesões	Dezenas-centenas	Dezenas-centenas	Uma a quatro
Frequência de comprometimento mucoso	38%	Ausente	3%
Padrão folicular	Presente	Ausente	Ausente
Padrão granulomatoso	Presente ou ausente	Ausente	Presente
Parasita no tecido	Pouco ou ausente	Abundante	Pouco ou ausente
Teste intradérmico	Positivo ou negativo	Negativo	Positivo
Título de anticorpo	Elevado	Elevado	Baixo

Na década de 80, essa forma da doença era rara na área endêmica de Corte de Pedra/BA e representava cerca de 0,2% dos casos de leishmaniose tegumentar⁽¹¹⁾, com registro de aumento para 1,9% dos casos na década de 90⁽²¹⁾. Essa forma da doença tem também sido descrita no Maranhão⁽¹⁰⁾. A leishmaniose cutânea disseminada acomete predominantemente homens adultos com atividade rural. Esses indivíduos são aparentemente sadios e não há associação dessa forma com a leishmaniose associada ao HIV, que pode apresentar múltiplas lesões mas com predomínio de lesões ulceradas. Os pacientes com leishmaniose disseminada, tipicamente, relatam o aparecimento de uma única lesão inicial ulcerada em uma extremidade corpórea, seguida, após um período de poucos dias, pelas lesões disseminadas que ocorrem de forma súbita e podendo se associar com manifestações clínicas de febre e astenia. Com a evolução e o tratamento há regressão rápida da maioria das lesões, mas raramente a cura é atingida com um curso de antimonial e, na maioria das vezes, os pacientes persistem com algumas lesões ulceradas por meses. Uma das complicações da leishmaniose disseminada é o comprometimento mucoso que pode ocorrer em até 38% dos casos⁽²¹⁾. Alguns relatos na literatura confundem a leishmaniose disseminada com a leishmaniose difusa. A Tabela 1 mostra os aspectos clínicos, histológicos, parasitológicos e imunopatológicos que permitem diferenciar a leishmaniose cutânea, disseminada e difusa.

A imunopatogênese da leishmaniose disseminada é pouco esclarecida e tanto fatores relacionados com o parasita como o hospedeiro podem participar do processo. Do ponto de vista do parasita, tem sido mostrado diferenças genotípicas entre isolados de *L. braziliensis*, que causam doença disseminada, quando comparados com isolados que induzem a outras formas da doença. Com relação à resposta imune do hospedeiro e comparando com a leishmaniose cutânea, a forma disseminada se caracteriza por uma produção menor de IFN- γ e de TNF- α ⁽²¹⁾. Essa diminuição da produção de citocinas do tipo 1 está relacionada mais com características do hospedeiro do que com o parasita.

Estudos realizados em diferentes áreas endêmicas têm mostrado que cerca de 10% dos indivíduos que vivem em área de transmissão de *L. braziliensis* apresentam um teste cutâneo de hipersensibilidade tardia positivo para antígeno de leishmania sem evidência da doença. Em um estudo realizado em Canoas, na zona rural do município de Santo Amaro/Bahia, foi observado que a razão forma subclínica para leishmaniose cutânea era de 104:29. Indivíduos com infecção subclínica apresentavam idade menos elevada e tinham um teste de hipersensibilidade tardia significativamente menor do que os pacientes que desenvolviam leishmaniose cutânea⁽⁹⁾. Do ponto de vista imunológico, esses pacientes apresentam uma resposta imunológica celular menos intensa do que a observada em leishmaniose cutânea, com níveis

menos elevados de IFN- γ do que os observados na forma clínica da doença. Esses dados indicam que tanto uma resposta Th1 exacerbada, como a observada na leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa, quanto a ausência da resposta Th1, como documentada na leishmaniose cutânea difusa, são maléficas para o hospedeiro; e que o ideal, após uma infecção causada por *L. braziliensis*, seria uma resposta imunológica modulada, capaz de impedir a proliferação de parasitas, mas sem levar a dano tecidual.

Referências Bibliográficas

- Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity*, 70: 6734-40, 2002.
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaró R, Barral-Netto M, Carvalho EM, & Johnson WD. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 536-46, 1991.
- Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *International Journal of Dermatology* 34(7):474-9, 1995.
- Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M & Carvalho, EM. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53: 256-259, 1995.
- Bittencourt AL, Rodrigues de Freitas LA. Diffuse cutaneous leishmaniasis. *Anatomo-pathologic aspects. Medicina Cutânea Ibero Latino Americana* 11(4):265-70, 1983.
- Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 84: 188-94, 1996.
- Carvalho EM, Barral A, Costa JML, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 56: 315-25, 1994.
- Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhaes AV, Barreto AC. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 89(6): 319-23, 1986.
- Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araujo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clinical Infectious Diseases* 34(11): E54-8, 2002.
- Galvão CE, Silva AC, Saldanha AC, Silva CM, Costa Mdo R, Costa JM. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania viannia braziliensis* in the state of Maranhao, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 26(2): 121-3, 1993.
- Jones TC, Johnson WD Jr, Barreto AC, Lago E, Badaró R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca F, Wiese K, Golightly L, Fikrig E, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Journal of Infectious Diseases* 156: 73-83, 1987.
- Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene* 77: 569-96, 1983.
- Marsden, PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia", Escomel 1911). *Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene* 80: 859-76, 1986.
- Marsden, PD. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Três Braços, Bahia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 27: 93-101, 1994.
- Machado P, Araujo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Bittencourt A, Carvalho EM. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clinical Infectious Diseases* 34(12):E69-73, 2002.
- Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Goncalves M, Reis MG, Carvalho L, Fernandes O, Barral-Netto M, Barral A. Frequency of infection of *Lutzomyia phlebotomines* with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97(2):185-8, 2002.
- Reed SG, Andrade ZA, Roters SB, Inverso JA, Sadigursky M. *Leishmania mexicana amazonensis* infections in 'resistant' inbred mice following removal of the draining lymph node. *Clinical Experimental Immunology* 64(1): 8-13, 1986.
- Ribeiro de Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 31: 143-8, 1998.

19. Schriefer A, Schriefer AL, Goes-Neto A, Guimaraes LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infection and Immunity* 72(1): 508-14, 2004.
20. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, De Souza AA, Ishikawa EA, Braga RR. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. *Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene* 85: 735-8, 1991.
21. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *Journal of Infectious Diseases* 186(12): 1829-34, 2002.
22. Walton BC. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds) *Clinical aspects and control*. Academic, London, p 637. (The leishmaniasis in biology and medicine vol 2), 1987.

Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e Perspectivas

Diagnostic Methods of Tegumentary Leishmaniasis: Facts, Fallacies and Perspectives

Bruno B. Andrade^{1,2}, Viviane Boaventura^{1,2}, Manoel Barral-Netto^{1,2,3}, Aldina Barral^{1,2,3}
*Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ¹; Faculdade de Medicina da Bahia, UFBA²; Instituto de
Investigação em Imunologia³; Salvador, BA, Brasil*

Pesquisas clínicas e laboratoriais recentes têm atentado para os aspectos individuais, entomológicos e epidemiológicos das diferentes manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar. Nas áreas endêmicas, o diagnóstico ideal deve ser realizado na fase inicial da apresentação clínica, para evitar as complicações da doença crônica. A escassez de suporte financeiro, estrutura laboratorial e pessoal especializado representam obstáculos importantes para esta realidade. Investigações diagnósticas tradicionais para casos individuais incluem a pesquisa de uma história sugestiva e características clínicas, a identificação de amastigotas através da histologia ou microscopia direta e testes sorológicos. O diagnóstico através da reação de polimerase em cadeia (PCR) parece representar uma técnica inovadora, tornando possível a rápida identificação de espécies e subespécies. A proposta desta revisão é discutir algumas das mais importantes questões do diagnóstico clínico e laboratorial da leishmaniose tegumentar. A sensibilidade e especificidade dos velhos e novos testes para identificar o parasita, produtos antigênicos, a resposta imunológica do hospedeiro e o diagnóstico molecular por PCR são considerados.

Palavras-chave: *Leishmania*, diagnóstico, leishmaniose, Montenegro, PCR.

Recent clinical and laboratory research has addressed the individual, entomological, and epidemiological aspects of different clinical manifestations of tegumentary leishmaniasis. In endemic areas, diagnosis should ideally be made during the initial phase of the clinical presentation of the disease to preclude complications of chronic disease. The scarcity of financial support, laboratory installations and qualified personnel represent important obstacles to achieving this goal. Traditional diagnostic tools for individual cases include the search for suggestive clinical history and features, the identification of amastigotes by histology or direct microscopy, and serologic tests. Polymerase chain reaction (PCR) seems to represent an innovative diagnostic technique, enabling the fast identification of Leishmania species and subspecies. The purpose of this review is to discuss some of the more important issues related to the clinical and laboratory diagnosis of tegumentary leishmaniasis. The sensitivity and specificity of both old and novel tests used to identify the parasite, antigenic products, the host immune response, and the molecular diagnosis by PCR are all discussed in this paper.

Key words: *Leishmania*, diagnosis, leishmaniasis, Montenegro test, PCR.

Recebido em 22/02/2005

Aceito em 27/05/2005

Endereço para correspondência: Dra. Aldina Barral, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz/FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, BA, Brasil, 40296-710. Tel (+55) 71 3356 8782 r. 215, FAX (+55) 71 3356 8782 r. 261. E-mail: abarral@cpqgm.fiocruz.br

Gazeta Médica da Bahia 2005;75(1):Jan-Jun:75-82.

© 2005 Gazeta Médica da Bahia (ISSN 0016-545X).

Todos os direitos reservados.

No Brasil e em muitos outros países subdesenvolvidos, a leishmaniose tegumentar (LT) apresenta-se de forma endêmica e constitui problema de saúde pública. Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas clínicas crônicas que podem determinar lesões desfigurantes e incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo ⁽¹⁴⁾.

Portanto, um diagnóstico preciso e precoce da LT é de extrema importância para o tratamento adequado e o controle das possíveis complicações da cronificação da doença. Entretanto, até o momento não se identificou um método “padrão-ouro” para o diagnóstico desta enfermidade. O diagnóstico de LT abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (pesquisa parasitológica e testes imunológicos). Frequentemente, a associação de alguns desses elementos é necessária para se chegar ao diagnóstico final ⁽²¹⁾. Apesar dos achados clínicos e da história epidemiológica poderem fortemente sugerir a possibilidade de leishmaniose, somente a identificação definitiva do parasita pode confirmar o diagnóstico. Os métodos diagnósticos parasitológicos atualmente utilizados apresentam baixa sensibilidade e desvantagens operacionais nas áreas endêmicas, uma vez que a infra-estrutura ainda é bastante deficitária nessas regiões. Por esta razão, a busca de testes mais eficazes utilizando métodos moleculares tornou-se necessária. Esta revisão pretende expor os métodos utilizados no diagnóstico da LT, avaliando criticamente a eficácia e a aplicabilidade nas áreas endêmicas e adequação ao modelo de assistência vigente no Brasil.

Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico da LT é sugerido na anamnese e baseia-se nas características da lesão associada aos dados epidemiológicos do doente (pacientes de áreas endêmicas ou que lá estiveram recentemente). As leishmanioses apresentam um vasto espectro de manifestações clínicas com envolvimento cutâneo e/ou das mucosas e cartilagens ⁽⁸⁾. A apresentação da doença é resultado de uma complexa interação entre o vetor, a espécie do parasita infectante e a resposta imunológica do hospedeiro. Assim, a LT abrange desde leishmaniose cutânea localizada (LC) e muco-cutânea (LM), representando o pólo responsivo do hospedeiro, até a forma cutânea difusa (LCD), representante do pólo não responsivo, no qual se evidencia uma baixa resposta imunológica do hospedeiro. Esta variação da apresentação clínica da LT torna o diagnóstico clínico difícil.

A espécie *Leishmania braziliensis* é a responsável pela maioria dos casos de LT no Brasil ⁽¹⁵⁾, sendo a *L. amazonensis* também considerada importante agente causador da doença nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-oeste do Brasil ^(3,24,29,38). Classicamente, a LT é caracterizada por uma úlcera cutânea indolor crônica, com bordas elevadas e fundo granuloso, com ou sem exsudação. A lesão se inicia no ponto de inoculação das promastigotas na epiderme do hospedeiro, através da picada de flebotômíneos do gênero *Lutzomyia* infectados. A lesão primária é, em geral, única, embora eventualmente múltiplas picadas do flebotômíneo ou a disseminação local possam gerar um número elevado de lesões ⁽²³⁾. O período de incubação é variável e pode oscilar entre 10 dias e três meses, no momento em que surge uma pápula eritematosa que progride lentamente para nódulo, antes da ulceração propriamente dita. Acompanha-se de adenopatia regional, com ou sem linfangite, em 12 a 30% dos casos. Três a cinco por cento dos pacientes desenvolvem lesões metastáticas para mucosas ⁽²²⁾. Quando causada por parasitas do complexo *L. braziliensis*, a lesão pode curar espontaneamente, pode disseminar ou ainda metastatizar para a nasofaringe, resultando na forma cutâneo-mucosa, mais frequentemente associada a esta espécie de parasita ⁽¹⁹⁾. Com a ocorrência dessas metástases, graves lesões desfigurantes e complicações secundárias também podem ocorrer, podendo ser fatal se não adequadamente tratadas ⁽²²⁾.

Com a evolução, ganha destaque o notável polimorfismo das lesões, sendo possível encontrar formas impetigóide, liquenóide, tuberculosa ou lupóide, nodular, vegetante e ectimatóide, o que dificulta ainda mais o diagnóstico. Assim, para o diagnóstico correto, devem ser excluídas as úlceras traumáticas, úlceras de estase venosa, úlceras de membros inferiores decorrentes da anemia falciforme, piodermites, paracoccidiodomicose, esporotricose, cromomicose, neoplasias cutâneas, sífilis, tuberculose cutânea e hanseníase virchowiana, a qual entra no diagnóstico diferencial da leishmaniose cutânea difusa ⁽⁸⁾. Nas lesões mucosas, o diagnóstico diferencial deve ser feito com a paracoccidiodomicose, hanseníase virchowiana, rinoscleroma, boubas, sífilis terciária,

granuloma médio facial e neoplasias⁽²²⁾. Assim, devido à dificuldade encontrada para o diagnóstico clínico seguro, os métodos laboratoriais fazem parte do arsenal de investigação.

Diagnóstico Laboratorial

A rotina diagnóstica laboratorial é feita através do exame direto de esfregaços ou impressão por aposição, da análise histopatológica das lesões, de testes sorológicos ou do teste cutâneo com antígenos de leishmania (reação de Montenegro). O diagnóstico definitivo depende da identificação de amastigotas em amostras de tecido coradas com *Giemsa* ou *Leishman*, analisadas à microscopia óptica ou por isolamento de promastigotas em meio de cultura⁽⁸⁾. A microscopia direta do esfregaço ou impressão possui uma baixa sensibilidade (50-70%) ao passo que a identificação de granulomas, com ou sem parasitas, na análise histopatológica parece apresentar boa sensibilidade (70-100%)⁽⁴⁰⁾. Infelizmente, esses métodos, na melhor das hipóteses, confirmam o diagnóstico de LT sem a especificação da espécie do parasita. A literatura descreve que os casos de LT causados por *L. braziliensis* manifestam-se com uma gravidade clínica maior e apresentam frequente falha ao tratamento convencional⁽³⁵⁾. Portanto, a identificação da espécie da *Leishmania* infectante traz um valor adicional de fator prognóstico, no momento em que é estimada a resposta clínica à terapêutica a ser instituída. Além disso, um considerável número de casos apresenta uma baixa carga parasitária na lesão, o que resulta em uma baixa sensibilidade desses métodos. A chance de se encontrar o parasita é inversamente proporcional ao tempo de duração da lesão, e a sensibilidade desses métodos nos casos causados por *L. braziliensis*, por exemplo, está em torno de 100% nos dois primeiros meses de evolução, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses⁽¹³⁾. No caso do Brasil, a detecção precoce é dificultada pela estrutura da assistência deficitária à saúde. Assim, a maioria dos casos de LT, quando identificadas pelos profissionais de saúde, se apresentam na fase crônica. Essas limitações trazem

óbvias implicações para os profissionais envolvidos nas decisões sobre os processos de intervenção terapêutica e ainda criam dificuldades para o estabelecimento de um prognóstico.

A cultura dos promastigotas *in vitro* permite a identificação da espécie presente na lesão. Entretanto, as espécies de *Leishmania* apresentam capacidade de crescimento variável em cultura e esse método requer uma série de condições laboratoriais, pessoal treinado e mais de 10 dias para a aquisição de um número suficiente de promastigotas para as investigações. A sensibilidade global desse método está em torno de 50% para *L. braziliensis*⁽²⁷⁾. Casos crônicos, como aqueles com baixa carga parasitária na lesão, também resultam em uma sensibilidade ainda mais reduzida desse método. Estas características tornam o método de isolamento do parasita em culturas inadequado para o inquérito epidemiológico em larga escala.

Outra forma de diagnóstico parasitológico é a inoculação de material da biópsia cutânea em animais de laboratório, de preferência hamsters (*Mesocricetus auratus*)⁽¹⁶⁾. Além do longo tempo necessário para a evolução da lesão no modelo animal (2 a 9 meses em média) e da necessidade de um laboratório adequado, a eficácia do isolamento apresenta grande variação conforme a espécie de *Leishmania*⁽⁴⁰⁾. Esse método, na verdade, é mais utilizado em laboratórios de pesquisa.

Anticorpos anti-leishmania estão presentes no soro de pacientes com LT e podem ser detectados por teste imunoenzimático (ELISA) ou imunofluorescência indireta (IFI), aglutinação direta e outros ensaios⁽¹⁴⁾. Esses métodos devem ser realizados em centros de referência com pessoal treinado, acarretando em uma aplicabilidade limitada no diagnóstico de um caso de LT em curso, não sendo rotineiramente utilizados na prática clínica. Entretanto, um estudo utilizando ELISA para a detecção de anticorpos IgG e IgM por meio de antígeno solúvel de *L. mexicana* (cepa ATCC 50157) foi descrito em 143 pacientes e 42 cães com LT no Brasil⁽³⁶⁾. Uma sensibilidade global de aproximadamente 92% foi apresentada por este simples método e os autores sugeriram que este teste tem potencial para ser aplicado nos diagnósticos individuais e epidemiológicos de LT nas regiões endêmicas.

Dentre os métodos sorológicos, a IFI é o mais utilizado. É uma técnica sensível, porém, existe a possibilidade de reações cruzadas, especialmente com o *Trypanosoma cruzi*, agente da doença de Chagas, e com a *L. chagasi*, agente da leishmaniose visceral, ambas as doenças muito prevalentes em áreas endêmicas de LT, causando confusão em termos de diagnóstico⁽¹⁸⁾. Por refletir a resposta do hospedeiro à infecção, a IFI apresenta resultados variáveis na LT, quer pela reduzida antigenicidade do parasita ou pelos baixos níveis de anticorpos circulantes. Na forma cutânea isolada, sua sensibilidade é estimada em 71% e pode alcançar 100% na forma mucosa, na qual a resposta imunológica do hospedeiro é intensa⁽²⁶⁾. Por outro lado, essa técnica mostra resultados habitualmente negativos na forma cutânea difusa, um reflexo da baixa resposta imunológica encontrada nesses pacientes. Em pacientes imunossuprimidos ou com lesões recentes (um a seis meses de evolução), é freqüente a negatividade sorológica. Quanto aos pacientes com sorologia positiva, os títulos de anticorpos médios são significativamente mais elevados (principalmente o isotipo IgG) naqueles que apresentam múltiplas lesões, refletindo a maior imunogenicidade induzida por uma exposição antigênica mais expressiva⁽¹⁴⁾. Além disso, constatou-se que o número de reações sorológicas negativas é maior entre os que possuem o exame parasitológico positivo quando comparado àqueles em que a pesquisa direta do parasita revela-se negativa⁽⁶⁾. Após o tratamento e cura, os títulos podem cair ou desaparecer em alguns meses.

Outras técnicas como o *Western blot* tem sido úteis no diagnóstico de infecções por *L. infantum*, no sul da França^(31,39), e o teste de aglutinação direta revelou sensibilidade satisfatória (90,5%) e especificidade (91,8%) em infecções cutâneas por *L. aethiopica*⁽¹⁷⁾.

O teste de intradermorreação de Montenegro tem sua origem descrita em 1926 e ainda hoje é amplamente utilizado, com uma boa aplicabilidade clínica e baixo custo^(8,27). Esse teste consiste na injeção intradérmica de um coquetel antigênico padronizado na face flexora do antebraço. Esse coquetel é preparado a partir de componentes

extraídos de culturas de promastigotas de *Leishmania* sp. e apresenta diferentes composições em várias partes do mundo, de acordo com os agentes etiológicos da LT de cada região⁽³²⁾. O teste de Montenegro toma como base o tipo de imunidade anti-leishmania desenvolvida pelo hospedeiro durante a doença ou após a cura da infecção. Essa resposta imunológica é caracterizada por uma hipersensibilidade celular tardia, apresentando infiltrados com predominância de linfócitos e macrófagos no sítio da infecção⁽⁴⁾. O que este teste detecta, portanto, é a reação de hipersensibilidade ao antígeno purificado injetado. O resultado é lido 48 ou 72 horas após a realização do teste e expressa um valor positivo quando se detecta uma endureção cutânea local maior que 5mm de diâmetro⁽²⁷⁾. Possui grande valor no diagnóstico da LT, constituindo valioso recurso diagnóstico nos casos em que os parasitas são escassos ou ausentes, sendo também bastante útil nos inquéritos epidemiológicos de áreas endêmicas. Estima-se uma positividade de 84 e 100% nas formas cutânea e muco-cutânea, respectivamente, e resultados negativos na forma cutânea difusa⁽³⁷⁾. Entretanto, o uso de um coquetel de antígenos favorece a uma significativa ocorrência de reações cruzadas, sendo a especificidade do teste baixa⁽²⁵⁾. Além disso, o teste de Montenegro se torna positivo em torno de quatro meses após o início da lesão cutânea, mas não diferencia doença atual e pregressa (na maioria das vezes permanece positivo após o tratamento), nem distingue doença de infecção e é habitualmente negativo nas formas cutâneas difusas e nos pacientes imunodeprimidos⁽²⁷⁾. Assim, a identificação de um teste positivo em um paciente de área endêmica, apesar de possuir importância epidemiológica, é irrelevante para o diagnóstico atual da infecção por leishmania em andamento, como discutido por Medeiros et al.⁽²⁵⁾ no contexto brasileiro.

Finalmente, novos métodos moleculares simplificados de alta sensibilidade e especificidade estão sendo desenvolvidos para o diagnóstico e seguimento terapêutico dos pacientes que podem ser aplicados para o diagnóstico taxonômico espécie-específico.

Situação e Perspectivas do PCR como Ferramenta Diagnóstica da LT

O diagnóstico definitivo da LT é feito a partir da demonstração da leishmania em amostras de tecido ou por meio de cultura ou inoculação de material extraído de pacientes em animais. Esses métodos são bastante laboriosos e requerem pessoal treinado para sua execução. Além disso, requerem longo intervalo de tempo até a obtenção dos resultados. Em vista dessas dificuldades, novos métodos moleculares foram desenvolvidos ⁽¹²⁾. Entre eles está a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). De fato, inúmeros ensaios de PCR foram desenvolvidos para a detecção de espécies de *Leishmania* em amostras clínicas ^(2,5,10,30,33,34). Estes ensaios objetivam a amplificação de genes do RNA ribossomal, de genes de minixon, de DNA do cinetoplasto e de seqüências de DNA repetitivo. Desta maneira, esses ensaios apresentam especificidade diferente: alguns identificam até a espécie do parasita em questão enquanto outros apenas detectam o mesmo na amostra. Esta informação é suficiente para os propósitos de diagnóstico. No entanto, uma maior especificidade pode contribuir diretamente para o entendimento da epidemiologia da leishmaniose.

A PCR é particularmente útil no caso da LT em decorrência da necessidade da confirmação parasitológica diante da possibilidade de tratamento. Além disso, os métodos ditos “convencionais”, como a intradermoreação de Montenegro e a sorologia, apresentam baixa sensibilidade. No caso de LT causada por *L. braziliensis*, a escassez de parasitas na lesão é um dos marcos da infecção, o que torna a confirmação parasitológica ainda mais difícil. Este fato pode ocasionar erros diagnósticos e, conseqüentemente, uma demora do início do tratamento, o que é especialmente preocupante uma vez que a *L. braziliensis* é capaz de se estabelecer em áreas de mucosa, levando à leishmaniose mucocutânea. A detecção precoce do parasita pode prevenir esses casos, permitindo a implementação do tratamento específico de pacientes nas áreas nas quais a *L. braziliensis* é prevalente.

Neste sentido, realizamos um estudo a fim de avaliar a contribuição da PCR no diagnóstico da LT causada por *L. braziliensis* ⁽¹¹⁾. Nossos resultados mostraram que a PCR foi positiva em 100% das biópsias de pele obtidas de pacientes com LT, independente dos resultados obtidos com outros métodos diagnósticos como a sorologia, cultura *in vitro* ou imunohistoquímica. Assim, a PCR apresentou uma positividade de 100%. Essa positividade foi calculada baseada no fato de que todos os pacientes desse estudo apresentaram cura clínica após o tratamento. A cura clínica, por sua vez, foi definida como cicatrização total da úlcera cutânea sem aparição de outras lesões até um ano após o término do tratamento. Embora a cura clínica não possa ser considerada o “padrão-ouro” no diagnóstico da LT causada por *L. braziliensis*, é um forte indicador de que o paciente estava realmente infectado com leishmania.

Nesse estudo, a PCR também se mostrou 100% específica, pois não detectamos o produto de amplificação em biópsias obtidas de pacientes com lesões cutâneas decorrentes de outras enfermidades ou mesmo em biópsias de pele de pacientes normais. A confirmação parasitológica, nesse mesmo trabalho, foi possível em 66% dos casos. No entanto, isto só ocorreu quando utilizamos a técnica de imunohistoquímica, o que confirma a escassez de parasitas nas lesões.

Mais recentemente, realizamos um outro estudo semelhante, onde mostramos que a PCR também é bastante sensível no diagnóstico da leishmaniose mucosa ⁽²⁸⁾. Nesse trabalho, mostramos que a PCR foi capaz de detectar o DNA do parasita em 97.1% dos casos. Essa positividade foi maior do que aquela encontrada nos outros métodos diagnósticos testados como a coloração com H&E e a imunohistoquímica.

Esses trabalhos, conjuntamente, mostram que a PCR é o melhor método diagnóstico da LT quando comparado com a confirmação parasitológica por meio de: microscopia direta, sorologia e isolamento de parasitas em cultura. Além disso, a PCR ainda é capaz de identificar a espécie de parasita presente na lesão, elevando a contribuição do diagnóstico. No entanto, os elevados custos associados à realização desta técnica e a

necessidade de equipamento apropriado ainda impedem que a PCR seja implantada nas áreas endêmicas. No entanto, a simplificação nos métodos de coleta e processamento de amostras, assim como a alta especificidade e positividade, indicam que a PCR será o método de escolha para o diagnóstico da LT e da leishmaniose muco-cutânea.

A Importância do Diagnóstico Precoce da Lesão Mucosa

A leishmaniose muco-cutânea (LM), também denominada espúndia, é condição de difícil tratamento e prognóstico sombrio quanto à possibilidade de cura clínica⁽²²⁾. Na maioria dos casos, afeta a região nasal anterior, principalmente o septo e o corneto inferior, causando deformidades importantes, como perfuração do septo e destruição da ponta nasal. Pode comprometer também a faringe e a laringe, apresentando risco de obstrução das vias aéreas e morte⁽⁷⁾. Acomete cerca de 4% dos pacientes que apresentaram doença cutânea, sendo geralmente diagnosticada de meses a anos após a cura da leishmaniose cutânea (LC)⁽⁴²⁾.

Os fatores que contribuem para que uma doença inicialmente cutânea evolua para essa forma tardia não são conhecidos. Llanos-Cuentas et al.⁽²⁰⁾ mostraram que o tratamento inicial inadequado pode estar associado com o desenvolvimento da LM.

A patogênese da LM é pouco compreendida. A virulência da *L. braziliensis*, principal espécie relacionada a essa forma clínica, é importante para o desenvolvimento da lesão mucosa. Entretanto, poucos parasitas são encontrados no tecido. Os pacientes apresentam exacerbação da resposta imune celular anti-leishmania com intensa produção de interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). A escassez de parasitas na lesão e a hiper-responsividade a antígenos de leishmania sugerem um papel importante da resposta imune na patogênese dessa forma clínica^(1,9).

A LM costuma apresentar sintomas inespecíficos, de forma que, usualmente, o diagnóstico é tardio quando o paciente já apresenta lesões destrutivas⁽²²⁾.

O diagnóstico clínico dos estágios iniciais da doença mucosa geralmente ocorre como um achado casual durante o exame físico rotineiro de pacientes com lesões cutâneas cicatrizadas. É difícil determinar em que momento a lesão mucosa se inicia. Entretanto, em alguns casos, o acometimento mucoso pode surgir precocemente, com a lesão cutânea primária ainda em atividade. Esses pacientes são assintomáticos ou apresentam sintomatologia inespecífica para o sítio mucoso e desenvolvem lesões iniciais que são detectadas apenas se for realizado exame rotineiro.

Para avaliar a eficácia do exame clínico minucioso na identificação precoce de casos de LM, realizamos um estudo recente no município de Jequié/BA (V. Boaventura, dados não publicados). Foi realizada avaliação otorrinolaringológica rotineira em 220 pacientes com diagnóstico de LC, sendo identificados alguns casos de lesão mucosa concomitante à LC primária (sem história prévia de leishmaniose). Na maioria desses pacientes, as lesões estavam restritas à mucosa nasal e em estágio inicial, sem destruição da cartilagem nasal anterior. Outros autores descreveram lesões mucosas iniciais. Villela et al.⁽⁴¹⁾ relataram três casos apresentando pontos esbranquiçados no septo nasal e corneto inferior. O tratamento adequado nesse estágio da doença pode evitar o desenvolvimento de lesões destrutivas.

A identificação de lesão mucosa em pacientes com doença cutânea primária demonstra a importância do exame otorrinolaringológico rotineiro dos indivíduos com LC. Esses achados sugerem ainda que muitos casos de LM tardia já podem apresentar alterações mucosas no momento do diagnóstico das lesões cutâneas primárias.

Tradicionalmente, as características clínicas em conjunto com o estudo histopatológico típico, o exame do esfregaço e testes sorológicos positivos representam a melhor evidência para o diagnóstico da LT. Além disso, tanto o diagnóstico clínico quanto o histopatológico podem, individualmente, apresentar 100% de sensibilidade, mas dependem da coleta adequada de uma amostra tissular apropriada e a análise deve ser efetuada por uma equipe experiente de profissionais de saúde. A análise histopatológica de amostras de tecidos das

lesões é particularmente relevante em termos de especificidade, sendo capaz de descartar importantes diagnósticos diferenciais, como lesões neoplásicas malignas e outras doenças infecciosas de significância epidemiológica.

A literatura recente tem confirmado que a detecção do DNA da leishmania em uma variedade de amostras cutâneas por PCR apresenta não somente uma sensibilidade e especificidade de 100%, mas também possibilita o diagnóstico da espécie ou até subespécie responsável pela doença. Essa vantagem da PCR em relação aos demais métodos proporciona uma estimativa do prognóstico e da resposta terapêutica, auxiliando as decisões sobre a condução dos casos pelos profissionais de assistência à saúde. Métodos simplificados para a aquisição de amostras e transporte e técnicas aprimoradas de purificação e análise de DNA têm sido aplicados com sucesso para a realização do diagnóstico individual e epidemiológico da LT. O uso combinado da PCR com os métodos tradicionais representa a melhor alternativa para o diagnóstico espécie-específico. Iniciativas para melhorar a disponibilidade desses métodos nas áreas endêmicas de países em desenvolvimento são emergencialmente necessárias. Este arsenal de técnicas deve objetivar sempre o diagnóstico e a intervenção terapêutica precoces que, quando somados a políticas públicas de saneamento competentes, podem reduzir consideravelmente os danos causados por esta doença infecciosa.

Referências Bibliográficas

1. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, and Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734-6740, 2002.
2. Belli A, Rodriguez B, Aviles H, and Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 58: 102-109, 1998.
3. Bittencourt A, Barral A, de Jesus AR, de Almeida RP, and Grimaldi Junior G. In situ identification of *Leishmania amazonensis* associated with diffuse cutaneous leishmaniasis in Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 585-586, 1989.
4. Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, and Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 53: 273-277, 1995.
5. Castilho TM, Shaw JJ, and Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J Clin Microbiol* 41: 540-546, 2003.
6. Chiari AC, Mayrink W, and Magalhães PA. Reação de imunofluorescência no controle do tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 15: 298-303, 1973.
7. Costa JM, Netto EM, and Marsden PD. Acute airway obstruction due to oedema of the larynx following antimony therapy in mucosal leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 19: 109, 1986.
8. Costa JML. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, 2000.
9. Da-Cruz AM, de Oliveira MP, De Luca PM, Mendonca SC, and Coutinho SG. Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 225-229, 1996.
10. de Bruijn MH and Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop* 52: 45-58, 1992.
11. de Oliveira CI, Bafica A, Oliveira F, Favali CB, Correa T, Freitas LA, Nascimento E, Costa JM, and Barral A. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 37: e149-153, 2003.
12. Degraive W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, and Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 463-469, 1994.
13. Furtado T. Critérios para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 65: 51-86, 1980.
14. Gontijo B and de Carvalho M de L. [American cutaneous leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 71-80, 2003.
15. Grimaldi G, Jr., David JR, and McMahon-Pratt D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 36: 270-287, 1987.
16. Grimaldi G, Jr., Jaffe CL, McMahon-Pratt D, and Falqueto A. A simple procedure for the isolation of leishmanial parasites and for the recovery of parasite virulence in avirulent stocks. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 560, 1984.

17. Hailu A. The use of direct agglutination test (DAT) in serological diagnosis of Ethiopian cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 42: 251-256, 2002.
18. Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical Review of Microbiology* 21: 123-152, 1995.
19. Llanos Cuentas EA, Cuba CC, Barreto AC, and Marsden PD. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 845-846, 1984.
20. Llanos-Cuentas EA, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC, and Campos M. Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. *Lancet* 2: 295, 1984.
21. Manson-Barh PE. Diagnosis. In: *The Leishmaniasis*, edited by R. PWK-K. Londres, 1987, p. 703-728.
22. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 859-876, 1986.
23. Marzochi MC. As Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina* 63: 82-104, 1992.
24. Marzochi MC and Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica* 10 Suppl 2: 359-375, 1994.
25. Medeiros AC, Rodrigues SS, and Roselino AM. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 35: 421-424, 2002.
26. Mendonca SC, Souza WJ, Nunes MP, Marzochi MC, and Coutinho SG. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 347-355, 1988.
27. Montenegro J. Cutaneous reactions in leishmaniasis. *Archives of Dermatology and Syphilology* 13: 187, 1926.
28. Oliveira JG, Novais FO, de Oliveira CI, da Cruz Junior AC, Campos LF, da Rocha AV, Boaventura V, Noronha A, Costa JM, and Barral A. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Trop* 94: 55-59, 2005.
29. Passos VM, Fernandes O, Lacerda PA, Volpini AC, Gontijo CM, Degraive W, and Romanha AJ. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Trop* 72: 251-258, 1999.
30. Pirmez C, da Silva Trajano V, Paes-Oliveira Neto M, da-Cruz AM, Goncalves-da-Costa SC, Catanho M, Degraive W, and Fernandes O. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 37: 1819-1823, 1999.
31. Pratlong F, Rioux JA, Marty P, Faraut-Gambarelli F, Dereure J, Lanotte G, and Dedet JP. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J Clin Microbiol* 42: 4077-4082, 2004.
32. Reed SG, Badaro R, Masur H, Carvalho EM, Lorencio R, Lisboa A, Teixeira R, Johnson WD, Jr., and Jones TC. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 35: 79-85, 1986.
33. Rodgers MR, Popper SJ, and Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 71: 267-275, 1990.
34. Rodrigues EH, Felinto de Brito ME, Mendonca MG, Werkhauser RP, Coutinho EM, Souza WV, Militao de Albuquerque Mde F, Jardim ML, and Abath FG. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 40: 3572-3576, 2002.
35. Romero GA, Guerra MV, Paes MG, and Macedo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg* 65: 456-465, 2001.
36. Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah GH, Hochberg L, Stiteler JM, and Martin SK. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 40: 1037-1043, 2002.
37. Shaw JJ and Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations of intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 69: 323-335, 1975.
38. Silveira TG, Teodoro U, Arraes SM, et al. An autochthonous case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 from the north of Parana State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 475-476, 1990.
39. Vabres P, Marty P, Kauffmann-Lacroix C, and Larregue M. [Imported cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* confirmed with immunoassay]. *Ann Dermatol Venereol* 128: 1047-1050, 2001.
40. Vega-Lopez F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 16: 97-101, 2003.
41. Vilela F, Pestana BR, and Pessoa SB. Presença de *Leishmania braziliensis* na mucosa nasal sem lesão aparente em casos recentes de leishmaniose cutânea. *Hospital* 16: 953-960, 1936.
42. Zajtchuk JT, Casler JD, Netto EM, Grogl M, Neafie RC, Hessel CR, de Magalhaes AV, and Marsden PD. Mucosal leishmaniasis in Brazil. *Laryngoscope* 99: 925-939, 1989.

Imunoterapia da Leishmaniose Tegumentar Americana

American Tegumentary Leishmaniasis Immunotherapy

Roque P. Almeida, Jussamara S. Brito, Paulo R. Machado

Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

O uso de citocinas ou de seus bloqueadores na leishmaniose tem sido estudado em vários ensaios clínicos, em função da imunopatogênese da doença e das dificuldades com uso convencional do antimonial pentavalente. O fator de crescimento de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) possui capacidade de matar a leishmania *in vitro*, modulando a resposta imune. Dois estudos randomizados e controlados verificaram sua utilidade como terapia adjuvante ao antimonial. No primeiro estudo, o GM-CSF aplicado intralesionalmente na úlcera, associado ao tratamento com antimônio, diminuiu seu tempo de cicatrização de 110 ± 61 dias (grupo controle) para 49 ± 33 dias ($p < 0,05$). No segundo estudo, o GM-CSF foi aplicado topicamente sobre a ulceração, reduzindo o tempo de cura de 104 ± 79 dias para 43 ± 14 dias ($p < 0,05$), comparado ao grupo controle. O racional para utilizar um inibidor da produção de TNF- α (pentoxifilina) na leishmaniose mucosa (LM) é baseado em observações que associam essa citocina a dano tecidual. Um estudo aberto verificou a eficácia da pentoxifilina oral associada ao antimonial em 10 pacientes com LM, refratários ao tratamento convencional. Nove dos 10 pacientes curaram as lesões mucosas em até 90 dias após o tratamento, sem apresentar recidiva após um ano de acompanhamento. Adicionalmente, um estudo randomizado e controlado documentou que a associação da pentoxifilina ao antimonial acelerou a cura da LM, sem necessidade de uma segunda série, comparado com o grupo controle. Esses dados sugerem que o GM-CSF e a pentoxifilina associados ao antimônio devem ser considerados no tratamento de casos refratários ou graves de leishmaniose tegumentar.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa, antimônio, GM-CSF, pentoxifilina, tratamento, imunoterapia.

Cytokines or cytokine antagonists have been used in clinical trials in tegumentary leishmaniasis because of the immunopathogenesis of this disease and the difficulties associated with antimony-based standard therapy. GM-CSF modulates immune response and is able to kill leishmania in vitro. It has been used to treat CL patients in two double-blind, randomized, placebo-controlled studies as an adjuvant therapy to antimony. In the first study, intralesional GM-CSF plus antimony significantly decreased the healing time of CL ulcers when compared to patients who received antimony alone (49 ± 32.8 versus 110 ± 61 days, $p < 0.05$). In the second study, GM-CSF was applied locally to treat CL ulcers. The patients who received GM-CSF plus antimony healed faster than control patients (43 ± 14 versus 104 ± 79 days, respectively, $p < 0.05$). The use of a TNF- α inhibitor (pentoxifylline) in mucosal leishmaniasis (ML) is based on observations that suggest a significant participation of this cytokine in tissue damage. An open study was carried out to evaluate the efficacy of oral pentoxifylline associated with antimony in 10 refractory ML patients. Nine out of ten cases were cured within 90 days following therapy and showed no evidence of relapse after one-year follow-up. Additionally, a randomized and placebo controlled study confirmed

Recebido em 22/02/2005

Aceito em 27/05/2005

Endereço para correspondência: Dr. Edgar M. Carvalho, Serviço de Imunologia, 5º andar, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n Canela, 40110-160, Salvador, BA, Brasil. Tel.: 55 71 3237-7353; Fax: 55 71 3245-7110. E-mail: imuno@ufba.br.

that pentoxifylline associated with antimony reduces the healing time in ML patients when compared to the control group, and requires no second course of antimony. These data show that GM-CSF and pentoxifylline plus antimonial therapy should be considered for the treatment of cutaneous or mucosal leishmaniasis in patients who are refractory to antimony therapy or those with severe forms of the disease.

Key words: Cutaneous leishmaniasis, mucosal leishmaniasis, antimony, GM-CSF, pentoxifylline, treatment, immunotherapy.

As diversas formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana estão associadas a um amplo espectro de resposta imune, variando desde uma forte resposta Th1 na leishmaniose mucosa, em contraste com uma pobre ou ausente resposta Th1 na leishmaniose cutânea difusa^(5,28). Os pacientes com as outras formas de leishmaniose cutânea apresentam resposta imune variável, porém com predomínio de resposta imune Th1, principalmente nas formas ulceradas e localizadas. O conceito de que uma resposta imune exacerbada pode ser prejudicial ao hospedeiro tanto quanto uma deficiência desta resposta é importante para o entendimento da patogênese da doença, assim como pode fornecer o racional para a imunoterapia. A presença de um equilíbrio entre a produção de citocinas Th1 e Th2 e entre a resposta imune protetora e a modulação dessa resposta, como observada em indivíduos com a forma subclínica da infecção causada por *L. braziliensis*⁽¹³⁾, indica que a modulação da resposta imune pode ser fundamental para evitar o aparecimento de lesões teciduais nos indivíduos que estão expostos à infecção.

A documentação da existência de uma forte resposta inflamatória e citotóxica com escassez de parasitas na lesão sugere que o dano tecidual observado na leishmaniose cutânea e mucosa é também consequência da incapacidade do hospedeiro de controlar esta resposta. Esse fenômeno torna-se ainda mais relevante no contexto onde a refratariedade ao tratamento com antimonial pentavalente (Sb^v) e a presença de recidiva se associam aos diversos efeitos colaterais devidos ao uso parenteral de Sb^v ou anfotericina B, limitando o controle adequado da doença. Todos esses fatores ressaltam a importância de pesquisar novas modalidades terapêuticas que contribuam para facilitar o tratamento nas áreas endêmicas tendo como base o conhecimento dos mecanismos da imunopatogênese da LTA e como a

imunoterapia pode contribuir para o tratamento dessas doenças.

Imunoterapia na Leishmaniose Cutânea

A forte associação entre a resposta imune do hospedeiro e a patogenia da infecção por leishmania faz com que a modulação da resposta imune seja uma das estratégias mais estudadas para o controle e a prevenção da leishmaniose. Experimentalmente, a combinação de imunoterapia e quimioterapia tem sido usada para aumentar a resposta ao antimonial. Em modelos experimentais de leishmaniose, a depleção de IL-4 em camundongos BALB/c infectados com *L. major* aumentou a eficácia da terapia com antimonial⁽²³⁾. Da mesma maneira, a combinação de IL-12 com antimonial induz a uma resposta protetora e promove cura nos camundongos infectados⁽²⁴⁾. Na última década, têm sido acumuladas experiências com citocinas e antagonistas de citocinas para o tratamento da leishmaniose. A associação de IFN- γ administrado sistemicamente e antimonial pentavalente foi efetiva para a cura de 11 pacientes com LTA ou leishmaniose mucosa, resistentes à terapêutica com antimonial⁽¹²⁾.

O fator de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é uma glicoproteína de peso molecular de 23.000 kDa, com papel importante no crescimento de células hematopoiéticas. A sua atividade biológica primária é a indução de colônias maduras de granulócitos e/ou macrófagos⁽²²⁾. Estudos prévios têm mostrado que o rhGM-CSF pode alterar a resposta imune à leishmania em humanos, por aumento da ativação macrofágica, indução de cicatrização e fibrose, e/ou por indução de uma resposta imune Th1 levando a uma apresentação mais eficaz de antígenos^(16,18,34).

Almeida et al. ⁽¹⁾ demonstraram, em um estudo duplo cego, randomizado, placebo controlado, que o uso rhGM-CSF intralesional na dose de 400µg, dividido em 2 doses de 200µg com intervalo de 7 dias, associado ao tratamento com antimonial (20mgSb^v/Kg/dia/20 dias, IV) na leishmaniose cutânea aumenta significativamente a chance de a lesão estar curada até 40 dias de tratamento (Figura 1). Esse tratamento também reduziu o tempo de cura em mais de 50% quando comparado com os pacientes tratados com antimonial e placebo. O tratamento com GM-CSF e antimônio aumentou significativamente a produção de IL-10 por células mononucleares do sangue periférico no oitavo dia de tratamento, em relação ao grupo tratado com antimonial isoladamente. A IL-10 é uma citocina que inibe a resposta pró-inflamatória suprimindo a síntese de IFN-γ por células T ou suprimindo a função macrofágica, portanto, tem propriedades imunorregulatórias ⁽²⁶⁾. É possível que a falta de uma modulação adequada da resposta imune, que pode ser conseguida pela IL-10, contribua na exacerbação da inflamação e no dano tecidual na leishmaniose cutânea.

Com base na observação da eficácia da aplicação tópica de rhGM-CSF em baixa dosagem na cicatrização de úlceras da perna de origem vascular ⁽¹⁵⁾, avaliamos o uso do rhGM-CSF tópico em baixa dosagem (10µg/aplicação, 3 vezes por semana, por 3 semanas), associado ao antimonial pentavalente (20mgSb^v/Kg/dia/20 dias, IV), no tratamento de pacientes com leishmaniose cutânea em um estudo randomizado, duplo-cego, placebo controlado, comparando com o tratamento com antimonial e placebo. Houve diminuição significativa do tempo de cicatrização na leishmaniose cutânea em relação ao grupo placebo (Figura 2)⁽³²⁾, sem efeitos colaterais e sem recidiva da doença após um ano de acompanhamento. Estes dois estudos abrem uma grande perspectiva para o uso do GM-CSF no tratamento da leishmaniose cutânea como uma modalidade mais simples de tratamento, com o custo final mais baixo e que pode ser utilizado nas áreas endêmicas.

O imiquimod a 5% é um novo imunomodulador aprovado pelo Federal Drug Administration (FDA,

USA) para uso tópico como creme. Esta droga exhibe atividade antiviral *in vitro* e em modelos experimentais. Tem sido utilizada para o tratamento de verrugas genitais por HPV ⁽⁹⁾. Experimentalmente, o imiquimod foi efetivo para o tratamento da leishmaniose induzida em camundongos ⁽⁶⁾ e, *in vitro*, ativa macrófagos contra a leishmania ⁽²¹⁾. Um estudo aberto com 12 pacientes portadores de leishmaniose cutânea resistentes ao tratamento com antimonial isolado mostrou cura clínica em 90% dos pacientes seguidos com a associação do antimonial ao tratamento tópico com imiquimod uma vez ao dia durante 20 dias ⁽²⁾. Os resultados obtidos com esse estudo aberto apontam para a necessidade de uma demonstração dos mesmos resultados em um ensaio clínico randomizado, placebo controlado.

A falência terapêutica observada com o antimonial em todas as formas clínicas de leishmaniose e as reações adversas relacionadas à dose e duração do tratamento apontam para a necessidade de novas estratégias para o tratamento dessa doença. As observações de que a imunoterapia adjuvante, além de diminuir o tempo de cicatrização das lesões, é efetiva para o tratamento de formas resistentes tornam essa perspectiva terapêutica a mais promissora atualmente.

Imunoterapia da Leishmaniose Mucosa

A leishmaniose mucosa (LM) é uma forma grave de LTA que se associa a intensas deformidades e seqüelas. O fato de não se descrever cura espontânea nesta forma de leishmaniose, e a evolução lenta e progressiva da doença, que pode resultar em êxito letal ⁽²⁰⁾, sublinham a necessidade de se desenvolver um tratamento eficiente e seguro para essa enfermidade. No entanto, até o presente momento, a LM representa uma doença na qual um tratamento associado a alto índice de cura e baixa morbidade permanecem um desafio.

Quimioterapia específica

O emprego do Sb^v ainda é a melhor opção terapêutica no controle da LM, mesmo após 50 anos da sua introdução no arsenal de medicamentos usados

Figura 1. Curva de Kaplan-Meier do ensaio clínico, randomizado, duplo cego, placebo controlado, usando GM-CSF intralesional (200 μ g) por injeção, em 2 doses com intervalo de 8 dias associado ao antimônio pentavalente (20mg/Kg/dia, 20 dias, IV) e salina intralesional associado ao antimônio pentavalente (20mg/Kg/dia, 20 dias, IV). A curva mostra a proporção de pacientes não curados com GM-CSF associado ao antimônio (——) e placebo associado ao antimônio (.....) após seguimento clínico de 360 dias.

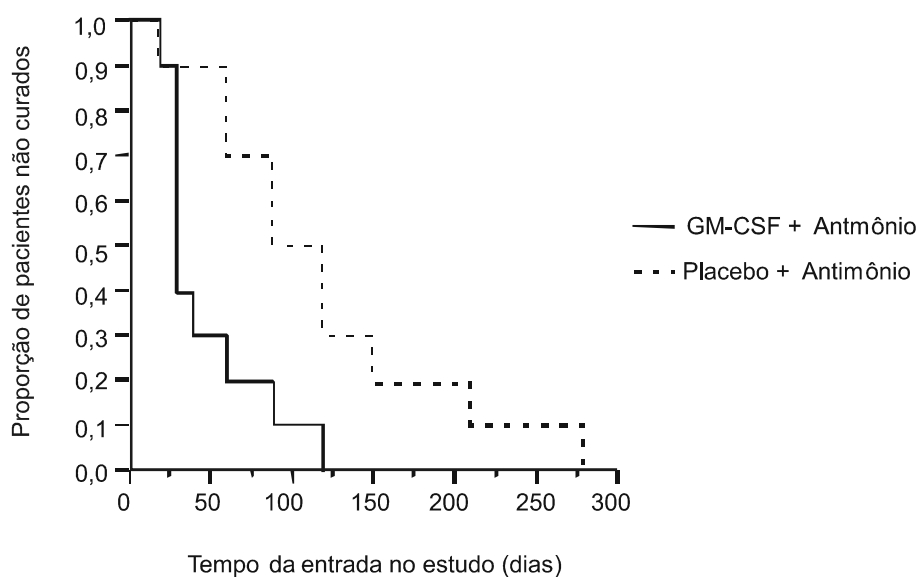
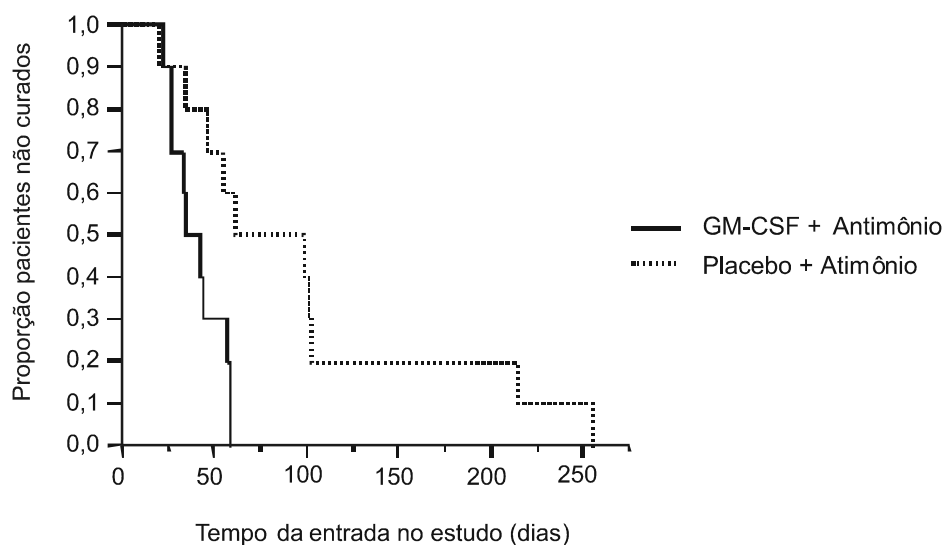


Figura 2. Curva de Kaplan-Meier do ensaio clínico, randomizado, duplo cego, placebo controlado, usando GM-CSF aplicado topicamente sobre a lesão (10 μ g) por aplicação, em 9 doses, 3 vezes por semana, por 3 semanas, associado ao antimônio pentavalente (20mg/Kg/dia, 20 dias, IV) e salina aplicada topicamente nos mesmos intervalos acima, associada ao antimônio pentavalente (20mg/Kg/dia, 20 dias, IV). A curva mostra a proporção de pacientes não curados com GM-CSF associado ao antimônio (——) e placebo associado ao antimônio (.....) após seguimento clínico de 360 dias.



na LTA⁽¹⁴⁾. Embora a maioria dos pacientes sejam curados com esse medicamento, a necessidade de usar doses elevadas (20 mg/Kg/dia) e por um longo período de tempo (30 dias) muitas vezes resulta no aparecimento de toxicidade, que pode impedir a manutenção da droga. Adicionalmente, muitos pacientes podem precisar de nova(s) série(s) de tratamento, aumentando a incidência de efeitos colaterais e o custo do tratamento. A resposta ao uso de Sb^v em pacientes com LM é variável. Falha terapêutica tem sido relatada em até 37% dos casos⁽²⁹⁾, enquanto um estudo realizado em Corte de Pedra/BA documentou que 17% dos pacientes com LTA, causada por *L. braziliensis*, tratados com Sb^v, apresentam recidiva em períodos variáveis de tempo⁽²⁵⁾. Diversos efeitos colaterais têm sido associados ao uso do Sb^v, incluindo artralgia, mialgia, dor abdominal, náuseas, cefaléia, cardiotoxicidade, elevação de enzimas hepáticas e de enzimas pancreáticas. A anfotericina B é a melhor opção para os pacientes com LM não responsiva a antimonial pentavalente, porém seu emprego requer hospitalização e sua utilização é limitada pela toxicidade⁽²⁰⁾.

Imunoterapia

O racional para o emprego de imunoterapia no tratamento da LM tem por base a presença de um intenso infiltrado inflamatório tecidual, contrastando com a pequena quantidade (nem sempre detectável) de parasitas *in situ*⁽⁴⁾, e exacerbação da resposta de imunidade celular contra o agente parasitário⁽⁷⁾. Embora a análise da expressão de RNA mensageiro para citocinas na lesão mucosa mostre um padrão misto Th1 e Th2, com predominância de IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10⁽²⁷⁾, um estudo recente, realizado por nosso grupo⁽³⁾, mostrou alta produção de IFN- γ e TNF- α no sangue periférico, cuja principal fonte são as células CD4⁺. Adicionalmente, a adição de IL-10 ou TGF- β neste sistema não é capaz de modular a alta produção dessas citocinas inflamatórias.

Diversos estudos indicam uma importante participação do TNF- α na gênese da lesão tecidual nos pacientes com LM: alta produção de TNF- α *in vivo* evidenciada pelos níveis elevados dessa citocina

no soro de pacientes com LM, comparados aos pacientes com LC⁽⁸⁾; alta produção por células mononucleares do sangue periférico em resposta aos antígenos de *Leishmania*⁽²⁸⁾; e diminuição dos níveis de TNF- α após o tratamento da LM⁽¹⁰⁾. Essa elevada produção de TNF- α e também de IFN- γ contribui para a síntese de óxido nítrico⁽¹⁹⁾ e para a destruição da *Leishmania*; porém, uma alta produção dessas citocinas pró-inflamatórias pode também resultar em uma intensa resposta inflamatória e dano tecidual. Esses dados sugerem que uma intervenção terapêutica baseada na diminuição dos níveis de TNF- α poderia beneficiar esses pacientes, a exemplo do eritema nodoso hansênico onde a talidomida e a pentoxifilina são empregadas com sucesso, através da inibição da síntese desta citocina^(31,33,35).

A pentoxifilina é uma droga de efeito vasodilatador, causando diminuição da adesividade e agregação plaquetária⁽³⁰⁾. A atuação da pentoxifilina no bloqueio da produção de TNF- α ocorre através da inibição da transcrição do gene para esta citocina⁽¹¹⁾. Outras ações no sistema imune e seus efeitos já foram descritos: aumento da quimiotaxia e deformidade leucocitária; diminuição da resposta leucocitária a IL-1 e TNF; inibição da ativação de linfócitos T e B e da atividade de células NK^(30, 36,37).

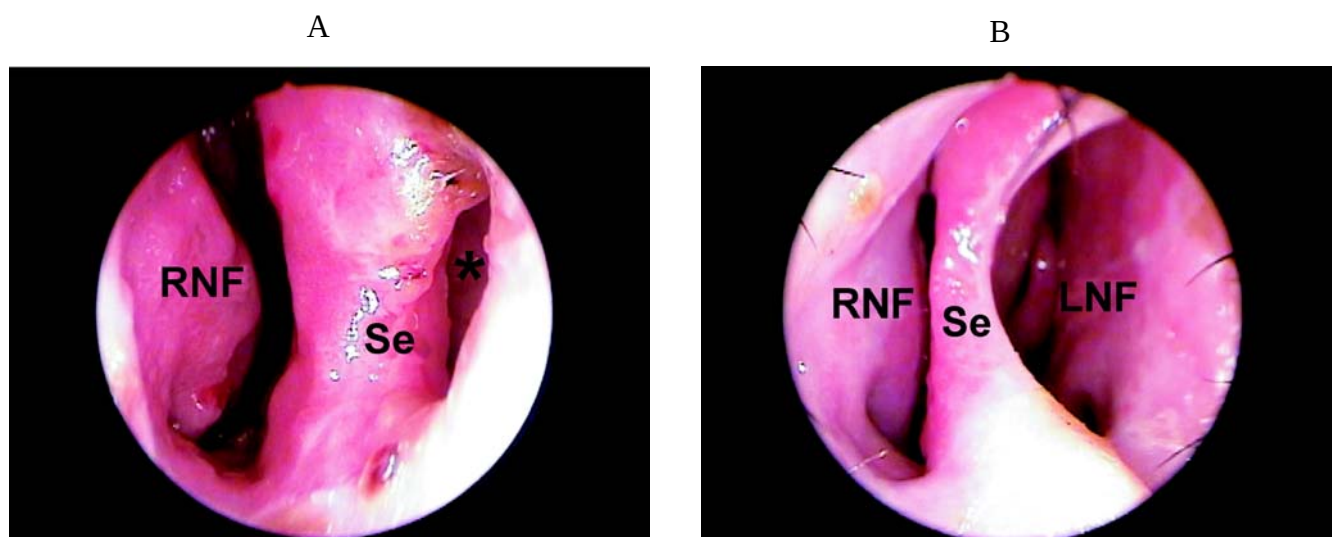
Em nosso estudo, a associação da pentoxifilina com antimonial foi avaliada em 10 pacientes com LM refratária, ou seja, com falha de pelo menos 2 séries de tratamento com Sb^v. A Tabela 1 mostra o perfil clínico dos pacientes. O acompanhamento otorrinolaringológico foi realizado a cada 30 dias, até, no mínimo, 1 ano, sendo depois realizado a cada 90 dias. O tratamento foi realizado com Sb^v na dose padrão de 20 mg/Kg/dia associado à pentoxifilina na dose de 400 mg, 3 vezes ao dia, durante 30 dias⁽¹⁷⁾. A cura foi documentada em 9 pacientes, ocorrendo em menos de 60 dias (8 casos) e 90 dias (1 caso) do início do tratamento. O único paciente com falha terapêutica apresentava longa duração da doença (128 meses) e já havia utilizado oito séries de Sb^v. Os níveis de TNF- α antes do tratamento (776 ± 342 pg/mL), caíram para 94 ± 57 pg/mL ($p < 0,05$) após 60 dias de tratamento. A associação medicamentosa da

Tabela 1. Perfil clínico dos pacientes com leishmaniose mucosa refratária

Paciente	Idade/Gênero	Leishmaniose cutânea prévia (meses)	Duração da doença mucosa (meses)	Reação de Montenegro (mm)	Séries prévias de antimônio	Doença nasal
TCM	10/F	Não	12	13	2	perfuração do septo
RJS	11/F	108	14	15	4	úlceras superficiais
MSS	23/M	120	9	25	2	deformidade da pirâmide nasal e perfuração do septo
MC	43/M	6	5	21	2	perfuração do septo
RSS	16/M	36	128	15	8	perfuração do septo
AES	21/M	36	6	27	2	úlceras profundas
RS	31/M	6	6	24	2	úlceras profundas
JTB	26/M	Não	5	15	2	úlceras profundas
JGS	51/M	132	108	13	4	perfuração do septo
LLS	58/M	360	6	14	3	úlceras profundas

Todos os pacientes apresentavam um teste cutâneo positivo para *Leishmania*, diagnóstico de leishmaniose mucosa por cultura para *Leishmania* ou histopatológico, e apresentaram falha terapêutica em pelo menos duas séries de antimônio pentavalente.

Figura 3. Aspecto clínico da leishmaniose mucosa. 3A - Leishmaniose mucosa com infiltração granulomatosa na fossa nasal direita e perfuração septal (RNF – fossa nasal direita; Se – septo; * - perfuração septal). 3B - Reepitelização completa da mucosa e da perfuração septal 90 dias após o início do tratamento no grupo da pentoxifilina (RNF – fossa nasal direita; Se – septo; LNF – fossa nasal esquerda).



pentoxifilina com antimonial foi segura e apenas um paciente apresentou náusea, sem necessidade de suspender o uso das medicações. O acompanhamento posterior dos 9 pacientes já completou 4 de evolução, sem documentação de recidiva em nenhum dos casos. Não existe nenhuma evidência de que a pentoxifilina destrua diretamente a *Leishmania in vitro* ou tenha capacidade de ativar macrófagos. Portanto, a maior contribuição da pentoxifilina na resposta terapêutica observada nesse estudo parece se dever a uma redução na reação inflamatória por inibição na produção do TNF- α e, conseqüentemente, ao dano tecidual. Além disso, o efeito vasodilatador da droga poderia permitir um maior acesso dos mecanismos de defesa e/ou do antimonial pentavalente no tecido e, por conseqüência, maior destruição da *Leishmania*.

Esses resultados positivos tornaram necessário um estudo controlado com placebo no sentido de confirmar o benefício desta associação no manejo eficiente da leishmaniose mucosa. Um ensaio clínico, duplo-cego e randomizado, foi realizado para avaliar o uso de pentoxifilina associada ao antimonial pentavalente comparado com Sb^v isolado em 23 pacientes sem tratamento prévio. Todos os pacientes do estudo apresentavam doença grave, com presença de granulação e perfuração septal, ou ulceração mucosa. Os pacientes foram tratados com Sb^v (20mg/Kg/dia) e pentoxifilina oral (400 mg, 3 vezes ao dia) por 30 dias ou Sb^v (20mg/Kg/dia) e placebo oral (3 vezes ao dia) pelo mesmo período. Todos os pacientes do grupo da pentoxifilina foram curados em até 90 dias após uma série de tratamento, enquanto 5 dos 12 pacientes do grupo placebo (41,6%) necessitaram de uma segunda série para obter a cura (Figuras 3A e 3B). O tempo de cicatrização no grupo da pentoxifilina foi de $84,5 \pm 38,7$ dias comparado a $145,8 \pm 98,6$ dias no grupo placebo ($p=0,039$). Nenhuma recidiva foi documentada em ambos os grupos após, no mínimo, um ano de acompanhamento. Esses dados demonstram que a associação da pentoxifilina ao tratamento padrão com antimonial pentavalente na LM acelera o tempo de cura da doença, evitando o uso de séries adicionais de Sb^v ao curar 100% dos casos.

Esses resultados demonstram que a pentoxifilina em associação com Sb^v foi capaz de curar pacientes com uma forma refratária de LM de maneira segura e eficiente, dado confirmado por estudo controlado com placebo em pacientes com doença grave, no qual a primeira série de tratamento com a associação curou todos os casos. Esse fato merece ser ressaltado já que a LM muitas vezes está associada a uma alta falha terapêutica e que a anfotericina B, droga de segunda escolha nessa situação, possui inúmeros efeitos colaterais, exigindo hospitalização geralmente prolongada. Nossos dados permitem a recomendação de que todos os pacientes com o quadro de LM grave ou não responsiva ao uso inicial de monoterapia com Sb^v sejam tratados com a associação de antimonial e pentoxifilina, antes do uso de outras drogas. Adicionalmente, a comprovação de que a imunoterapia, tendo como o alvo o TNF- α , na LM é eficaz, abre perspectivas para a realização de outros ensaios terapêuticos com outros medicamentos de ação semelhante, ou a própria pentoxifilina, em associação com Sb^v em doses menores, com o benefício de maior praticidade assistencial na zona rural e menor toxicidade para os pacientes. Esta contribuição pode ser inestimável para o controle desta doença intrigante e grave que atinge uma parcela considerável de indivíduos em idade produtiva no meio rural, onde a carência de assistência médica é uma realidade.

Referências Bibliográficas

1. Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Machado P, Bacellar O, Ko AI, Ribeiro de Jesus A, Mobashery N, Santos JB, Carvalho EM. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 180: 1735-1737, 1999.
2. Arevalo I, Ward B, Miller R, Meng TC, Najar E, Alvarez E, Matlashewski G, Llanos-Cuentas A. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clinical Infectious Diseases* 33(11): 1847-1851, 2001.

3. Bacellar O, Lessa H, Schrieffer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity* 70: 6734-6740, 2002.
4. Bittencourt AL & Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86: 51-56, 1991.
5. Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 84: 188-194, 1996.
6. Buates S, Matlashewski G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. *Journal of Infectious Diseases*, 179:1485-94, 1999.
7. Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JLM, Reed S, Rocha H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *Journal of Immunology*, 135: 4144-8, 1985.
8. Castés M, Trujillo O, Rojas ME, Fernandez CT, Araya L, Cabrera M, Blackwell J, Convit J. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biological Research* 26: 233-238, 1993.
9. Cox JT, Petry KU, Rylander E, Roy M.J Using imiquimod for genital warts in female patients. *Womens Health (Larchmt)* 13(3): 265-271, 2004.
10. Da-Cruz AM, Oliveira MP, De Luca PM, Mendonça SCF, Coutinho SG. Tumor Necrosis Factor- α in human American tegumentary leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91: 225-229, 1996.
11. Doherty GM, Jensen JC, Alexander HR, Buresh CM & Norton JA. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery* 110: 192-198, 1991.
12. Falcoff E, Taranto NJ, Remondegui CE, Dedet JP, Canini LM, Ripoll CM, Dimier-David L, Vargas F, Giménez LP, Bernabó JG, Bottasso AO. Clinical healing of antimony-resistant cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis following the combined administration of interferon-gamma and pentavalent antimonial compounds. *Transaction Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88: 95-97, 1994.
13. Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araujo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clinical Infectious Diseases* 34: E54-8, 2002.
14. Herwaldt BL & Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46: 296-306, 1992.
15. Jaschke E, Zabernigg A, Gattinger C. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied locally in low doses enhances healing and prevents recurrence of chronic venous ulcers. *International Journal of Dermatology* 38: 380-386, 1999.
16. Jones TC. The effects of rhGM-CSF on macrophage function. *European Journal of Cancer* 29: 10-13, 1993.
17. Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho EM. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65: 87-89, 2001.
18. Lieschke GL, Burgess AW. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage-colony stimulating factor. *New England Journal of Medicine* 327: 99-106, 1992.
19. Liew FY. Regulation of nitric oxide synthesis in infectious and auto-immune diseases. *Immunology Letter* 43: 95-98, 1994.
20. Marsden, PD. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Três Braços, Bahia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27: 93-101, 1994.
21. Martin-Garcia RF. New insights into imiquimod's mechanisms of action. *Drugs Dermatology* 3(3): 247-249, 2004.
22. Metcalf D & Burgess AW. Clonal analysis of progenitor cell commitment to granulocyte or macrophage production. *Journal of Cellular Physiology* 111: 275-283, 1982.
23. Nabors GS & Farrell JP. Depletion of IL-4 in BALB/c mice with established *L. major* infections increases the efficacy o antimony therapy and promotes Th1 like responses. *Infection & Immunity* 62: 5498-5504, 1994.
24. Nabors GS, Afonso LCC, Farrell JP, Scott P. Switch from a type 2 to a type 1 T helper cell response and cure of established *L. major* infection in mice is induced by combined therapy with IL-12 and pentostam. *Proceedings of National Academy Science USA* 92: 3142-3146, 1995.
25. Netto EM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Costa JML, Cuba CC, Barreto AC, Badaró R, Johnson WD, Jones TC. Long-term follow-up of patients with *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection and treated with Glucantime. *Transaction Royal Society Tropical Medicine Hygiene* 84: 367-370, 1990.
26. Oppenheim JJ & Ruscetti FW. Cytokines In: Stites DP, Terr IA, Parslow TG (ed.), *Medical Immunology*, 9ª ed., Appleton & Lange, Stamford, Connecticut, 146-168, 1997.
27. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F & Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *Journal of Clinical Investigation* 91: 1390-1395, 1993.

28. Ribeiro de Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31: 143-8, 1998.
29. Saenz RE, de Rodrigues CG, Johnson CM, Berman JD. Efficacy and toxicity of pentostam against panamensis mucosal leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 394-398, 1991.
30. Samlaska CP, Winfield EA. Pentoxifylline. *Journal Am Acad Dermatology* 30: 603-621, 1994.
31. Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A, Nery JAC, Miguel CP, Viana SM, Sarno EN. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *Journal of Infectious Diseases* 169: 408-414, 1993.
32. Santos JB, de Jesus AR, Machado PR, Magalhaes A, Salgado K, Carvalho EM, Almeida RP. Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Infectious Diseases* 190(10): 1793-1796, 2004.
33. Sarno EN, Grau GE, Vieira IMM, Nery JAC. Serum levels of TNF α and IL-1 during leprosy reactional states. *Clinical Experimental Immunology* 84: 103-108, 1991.
34. Stanley IJ, Burgess AW. GM-CSF stimulates the synthesis of membrane and nuclear proteins in murine neutrophils. *Journal Cellular Biochemistry* 23: 241-258, 1983.
35. Talhari S, Orsi AT, Talhari AC, Souza FH, Ferreira LC. Pentoxifylline may be useful in the treatment of type 2 leprosy reaction. *Leprosy Rev* 66: 261-263, 1995.
36. Ward A & Clissold SP. Pentoxifylline: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs* 34: 50-98, 1987.
37. Zabel P, Schade FU, Schlaak M. Inhibition of endogenous TNF formation by pentoxifylline. *Immunobiology* 187: 447-463, 1993.

A Aplicação e o Conceito de Raça em Saúde Pública: Definições, Controvérsias e Sugestões para Uniformizar sua Utilização nas Pesquisas Biomédicas e na Prática Clínica

The Concept of Race in Public Health: Definitions, Controversies and Recommendations to Improve Its Use in Biomedical Research and Clinical Practice

Crésio Alves¹, Cristina M. M. Fortuna¹, Maria Betânia P. Toralles¹

Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

A categorização dos seres humanos em raça e etnia é um dos temas mais controversos e discutidos em medicina. antropologistas e geneticistas acreditam que, do ponto de vista biológico, raças humanas não existem. Para eles, raça é um construto social (baseado em características físicas) que se modifica com o tempo; e etnia um conceito que incorpora na sua definição variáveis culturais, sociais, religiosas, lingüísticas e dietéticas. Apesar desses argumentos, a variável raça continua a ser usada no ensino, prática e pesquisa médica, com o objetivo de avaliar diferenças sociais e biológicas na evolução das doenças e no seu tratamento. Na maioria das situações, traços físicos são os elementos utilizados para a classificação racial. Com o crescente aumento da miscigenação racial e étnica e a descoberta parcial do genoma humano, os profissionais de saúde tem sido desafiados a repensar os conceitos de raça e etnia. Alguns pesquisadores têm sugerido que tais classificações não possuem utilidade nas pesquisas biomédicas e que deveriam ser banidas. Outros acreditam que a variável raça influencia nas causas, expressão e prevalência de várias doenças e defendem seu uso. O objetivo desse trabalho é discutir a aplicação, conceito, controvérsias e classificações de raça; sua relação com etnia, racismo, medicina, doenças e farmacogenômica, e concluir com uma série de sugestões sobre como otimizar o uso desses conceitos nas pesquisas biomédicas e na prática clínica. **Palavras-chave:** Raça, racismo, etnia, pesquisa biomédica, medicina, saúde pública.

Concepts of race and ethnicity are among the most controversial, debatable and misunderstood classifications. Anthropologists and human geneticists agree that, from a biological standpoint, human race does not exist. For these scientists, race is a social construction (based on heritable physical features) that is constantly being redefined; and ethnicity a concept that incorporates cultural, social, religious, linguistic and dietary variables. Despite these arguments, race continues to be used in medical teaching, practice and research to measure social and biological differences in health and treatment outcomes. Most of the time, physical traits are used for racial categorization. With the increase in racial and ethnic heterogeneity and the partial discovery of the human genome, healthcare providers are increasingly faced with the issue of how best to assess race and ethnicity. Some investigators have suggested that racial classification may not be useful for biomedical studies, whereas others believe that there are racial and ethnic differences in the causes, expression and prevalence of various diseases. The purpose of this paper is to discuss the applications, concepts, measurements and controversies of race, its relationship with ethnicity, racism, medicine, disease and pharmacogenomics and the final conclusions offer recommendations on how to improve the application of race and ethnicity in biomedical research and clinical practice.

Key words: Race, racism, ethnicity, biomedical research, medicine, public health.

Recebido em 20/01/2005

Aceito em 13/04/2005

Endereço para correspondência: Dr. Crésio Alves, Rua Plínio Moscoso, 222 (Apto. 601), 40.157-190, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: cresio.alves@uol.com.br.

Nos últimos anos, especialmente após a definição e maior conhecimento do genoma humano, o debate sobre o uso e a importância da classificação racial na pesquisa biomédica e na prática clínica voltou a ser discutido na literatura científica. Sobre este tema, as opiniões são muito divergentes e raramente conciliatórias^(24,34). Portanto, se faz necessária a revisão desse tema para tentar sumarizar as principais informações sobre tão polêmico assunto com o objetivo de facilitar a leitura crítica do mesmo.

As múltiplas definições da palavra raça servem para dar uma idéia ao leitor da complexidade do tema^(15,34). Por exemplo, raça pode ser definida como: 1) termo utilizado como forma de estratificação social, o qual usa traços físicos para sua classificação; 2) categoria social relacionada à classe; 3) construto social e não biológico uma vez que sua definição varia de acordo com o local e a cultura; 3) população que se distingue de outras pela frequência com que herda traços físicos geneticamente determinados; 4) o conceito não tem fundamentação científica, já que sua definição difere de acordo com a percepção social prevalente a cada momento; 5) casamento entre fatores biológicos e sociais; 6) grupo de pessoas classificadas em conjunto tendo por base uma história comum, nacionalidade ou distribuição geográfica; 7) populações mais ou menos isoladas que diferem uma das outras pela frequência de suas características hereditárias; 8) variável de distribuição contínua onde inexistente um marco que determine o limite entre ser branco e ser negro.

Como visto, raça é um termo que não possui o mesmo significado para todas as pessoas e sua definição depende, em grande parte, do motivo pelo qual é usada. Segundo Cavalli-Sforza⁽²⁹⁾ (2003), qualquer classificação racial é arbitrária, imperfeita e difícil. O mais fundamental aspecto biológico das raças está naquilo que as une e não naquilo que as separa⁽¹³⁾, uma vez que baseado em todas evidências disponíveis não existem diferentes raças humanas do ponto de vista biológico⁽⁴⁸⁾.

Nesta revisão, abordaremos desde a origem da espécie humana, às diferentes formas de classificação racial, raça em populações miscigenadas, relação entre raça e etnia, raça e racismo, raça e medicina, raça e

doença, raça e farmacogenômica, argumentos a favor e contra a categorização racial em medicina e finalizaremos com a conclusão onde além de resumir as informações discutidas serão apresentadas algumas propostas para o uso desse conceito em medicina.

Origem da Espécie Humana

Até a década de 80 do século XX, a teoria prevalente para o surgimento da espécie humana era a do poligenismo, segundo a qual *Homo Sapiens* tinha se originado de diferentes populações primitivas em várias partes do mundo. Os ancestrais dos europeus teriam evoluído do homem de Neanderthal, os asiáticos do Homem de Pequim e assim por diante. Isso sugeria diferenças profundas entre as raças e, para alguns, uma hierarquia entre elas – talvez nem todas tivessem evoluído ao mesmo tempo e no mesmo ritmo. A partir de estudos genéticos e populacionais na década de 90 do século XX, foi possível mostrar que a espécie humana ao contrário do que se pensava, tem um antepassado comum que viveu na África há 144.000 anos^(29,40). Este ancestral comum do homem moderno começou o povoamento do mundo há 70 mil anos por meio de ondas de migrações pelo planeta. Ao se fixarem em regiões climáticas diferentes, o processo de seleção natural foi acentuando traços físicos que permitiam melhor adaptação ao ambiente⁽¹³⁾. Os habitantes da região nórdica (mais fria e com pouca luz solar) acentuaram características físicas como pele clara para facilitar a síntese da vitamina D, narinas estreitas para aquecer o ar e maior quantidade de pelos para se proteger do frio; enquanto os habitantes da região equatorial (mais quente e com muita luz solar) acentuaram traços como a pele escura para proteção contra a luz solar, narinas mais largas e menor quantidade de pelos para se adaptar melhor ao calor⁽¹³⁾.

Assim, a predominância dessa ou aquela característica física em diferentes grupos humanos decorreram de alterações adaptativas e relativamente recentes ao clima e ao ambiente como resultado de mutações genéticas que se tornaram mais frequentes por conferir vantagens aos seus portadores⁽¹³⁾.

Portanto, as diferenças físicas (*e.g.*, cor da pele, tipo de cabelo) que deram origem à designação de raças, nada mais são que mudanças adaptativas as quais tem pouco a ver com a real distância genética entre as populações. Os Papuas por terem a pele negra, o cabelo encarapinhado e as feições físicas semelhantes aos dos africanos da Guiné, na África Ocidental tiveram sua pátria batizada pelos colonizadores de Nova Guiné. Entretanto, a distância genética entre esses dois povos é uma das maiores já identificadas, bem maior que entre Papuas e Dinamarqueses ⁽²⁹⁾.

Atualmente, a distribuição gênica mostra que o parentesco entre populações tradicionalmente identificadas como raças humanas é muito mais próximo do que se pensava. Em média a distância genética entre dois indivíduos de uma mesma população equivale a 85% da existente entre duas pessoas de populações diferentes, o que corrobora a inexistência de diferentes raças humanas ⁽⁴⁶⁾.

Classificação Racial

A definição e classificação de raça é uma questão difícil e polêmica. O que faz um indivíduo pertencer a determinado grupo racial varia de acordo com a época e a região do mundo em que ele vive e com os interesses políticos e culturais em classificá-lo em um determinado grupo. Para alguns, a raça é usada para distinguir pessoas não só com base em suas características físicas como também em seus atributos morais e psicológicos refletindo um claro, preconceituoso e discriminatório uso dessa classificação.

Outra dificuldade é a impossibilidade de se transpor ou comparar classificações raciais entre países diferentes. Algumas classificações enfatizam cor da pele (Brasil), outras, ancestralidade (Estados Unidos), outras, etnicidade (Inglaterra) e assim por diante. As diferenças raciais entre países também são influenciadas pelo conceito de raça e pelo método de obter os dados. Essas modificações na maneira de classificar as pessoas pelos censos demográficos e a mudança no modo de fazer a autodeclaração tem implicações importantes nas estatísticas de saúde e nas políticas estruturais

desenvolvidas a partir dessas informações. No Brasil, tem-se observado recentemente a tendência em se adotar a classificação baseada em origem geográfica agrupando os indivíduos até então classificados como negros e pardos em um grupo denominado afro-descendentes. Com isso, a variação na frequência de determinada doença pode não se dever a variável racial e sim a maneira como as pessoas se identificam ou são classificadas racialmente ⁽⁸⁷⁾.

Antropologia Física

Em 1758, Carl von Linne (Linnaeus), taxonomista e botânico sueco, classificou a espécie humana em quatro grupos (europeus, americanos, asiáticos e africanos) de acordo com critérios físicos e psicológicos. Nessa classificação já se observa não apenas um preconceito como também a tentativa de hierarquizar os grupos. Os europeus foram definidos como “gentis... inventivos... governados por leis”; os americanos como “pele de cobre... obstinados... governados por costumes”; os asiáticos como “severos... governados por opiniões”; e os africanos como “indolentes... negligentes....governados por capricho” ⁽⁹¹⁾. Posteriormente, em 1775, Johann Friedrich Blumenbach, antropologista alemão, usou pela primeira vez a palavra “raça” para classificar os humanos em cinco grupos: caucasianos ou *brancos*, mongóis ou *amarelos*, etíopes ou *negros*, americanos ou *vermelhos*, e malásios ou *pardos*. O termo “caucasiano” foi criado por Blumenbach porque ele acreditava que a região do Cáucaso na Ásia produzia a “mais bonita raça de homens” ⁽³¹⁾. Um século depois, em 1855, o francês, Conde de Gobineau, no seu “Ensaio sobre as desigualdades das raças” dissemina o conceito de que certas raças não tinham capacidade para progredir tanto como outras.

Os traços físicos foram muito afetados pelo processo de seleção natural e não há dúvida que as variações morfológicas são capazes de distinguir alguns grupos populacionais. Como relatam Pena&Bortolini⁽⁵⁹⁾ (2004), seria muito difícil para alguém confundir um europeu nórdico, com um índio americano ou com um negro africano.

Desde então e até os dias de hoje, os traços morfológicos (fenótipo) continuam a ser os critérios mais usados para classificar pessoas dentro de grupos raciais. Os principais métodos usados para esse fim e que diferem de um local para o outro, são: cor da pele (Censo demográfico brasileiro), mancha mongólica⁽⁷³⁾, perfil do crânio^(37, 67, 68) e variadas combinações de caracteres físicos como cor da pele, textura do cabelo, espessura dos lábios e forma do nariz^(5, 45, 91).

Dentre todas as características físicas, a cor da pele é o marcador mais usado sendo inclusive no Brasil entendido como sinônimo de raça. A cor da pele depende da quantidade e tipo de melanina presente na derme e suas diversas cores são determinadas por apenas seis genes dos quais o mais importante é o gene do receptor da melanocortina 1^(53, 66, 82). O seu uso como indicador exclusivo de classificação racial é fonte de vários vieses, não apenas culturais como também aqueles decorrentes de forte efeito ambiental, decorrente da exposição aos raios solares.

Também, por ser uma variável continua, não se pode estabelecer com precisão onde começa uma cor e termina outra. Segundo Witzig⁽⁹¹⁾ (1996) “ninguém é absolutamente branco, absolutamente negro ou de qualquer outra cor”. A cor da pele também não se relaciona com a forma do nariz nem com a textura do cabelo o que torna as tentativas de se classificar pessoas, com base na cor da pele, ainda mais frágil. Desse modo, alguém de pele branca, nariz achatado e cabelo encarapinhado, poderia ser classificado como branco de acordo com a cor de sua pele ou como descendente de negro pelas outras características físicas. Esse assunto é tão ambíguo que brasileiros aos serem entrevistados no Censo demográfico de 1980 sobre qual era a sua cor forneceram como resposta centenas de cores diferentes⁽⁸⁷⁾.

O uso de um conjunto de caracteres físicos (*e.g.*, cor da pele, textura do cabelo, espessura dos lábios, forma do nariz) para classificação racial é ainda mais problemático. Ao tentar se associar os vários traços morfológicos individuais o número de raças humanas aumenta consideravelmente, chegando a variar de 30 a centenas de grupos raciais diferentes^(5, 91).

A experiência de classificação racial fenotípica do Brasil é marcada por dois estudos. Em 1965, Krieger et al.⁽⁴⁵⁾, geneticistas norte-americanos e brasileiros, estudaram 1.068 famílias do nordeste do Brasil e propuseram uma classificação racial baseada na avaliação da pigmentação do abdome, cor e tipo de cabelo, e na conformação dos lábios e nariz. Esta classificação era composta de sete grupos: branco, mulato-claro, mulato-médio, mulato-escuro, negro, amarelo-claro e amarelo-escuro. Ao correlacionar esta classificação com marcadores de 17 sistemas genéticos polimórficos, os autores mostraram o grau de miscigenação da população estudada. As pessoas classificadas como negras tinham 28% de mistura européia e 5% de contribuição ameríndia; e as classificadas como brancas 18% de mistura africana e 12% de contribuição ameríndia. Entretanto, eles não descreveram como codificar as diferenças do exame físico entre os sete grupos de modo que esta classificação pudesse ser reproduzida com mais objetividade em outros estudos.

Mais recentemente, em 2003, Parra et al.⁽⁵⁷⁾, geneticistas da Universidade Federal de Minas Gerais, usaram uma classificação morfológica que alocava os participantes em três classes: branco, negro e intermediário. Os parâmetros observados foram: formato dos lábios (finos, medianos, grossos), formato do nariz (proeminente/ ponta arrebitada, ponta achatada e achatado), pigmentação da pele na parte interior do braço (branca, marrom e preta), pigmentação dos olhos (azuis, verdes, castanhos e pretos), cor do cabelo (claro, castanho, preto e ruivo) e tipo do cabelo (liso, encarapinhado, ondulado). Os participantes de pele branca, cabelo liso ou ondulado, nariz proeminente ou arrebitado, lábios finos ou medianos, independente da cor do cabelo ou pigmentação dos olhos foram classificados como brancos. Os indivíduos com pele negra, cabelo encarapinhado e pretos, olhos pretos e lábios grossos foram classificados como negros. Os demais foram classificados como intermediários. Ao estudarem através de um painel de alelos populacionais específicos o índice de ancestralidade africana (IAA)⁽⁵⁶⁾ concluíram que a cor de uma pessoa determinada por suas

características físicas é um fraco preditor de sua ancestralidade africana⁽⁵⁷⁾.

Esses dois estudos comprovam uma vez mais o risco e a falta de consistência, comumente vistas na literatura médica, de se usar como sinônimos “brancos, caucasianos e europeus” ou “negros e africanos”⁽⁵⁷⁾.

Em todas estas classificações fenotípicas existem mais dúvidas do que certezas: 1) Que score atribuir a cada um dos itens analisados? No estudo de Parra et al.⁽⁵⁷⁾ (2003), a cor do cabelo e a pigmentação dos olhos não tinham “peso” suficiente para excluir alguém do grupo dos brancos; 2) Africanos e aborígenes australianos possuem a mesma cor de pele, mas tem a textura de cabelo completamente diferente. Pertenceriam eles a mesma raça ou a raças diferentes? 3) Uma pessoa de pele branca, mas portadora de genes resistentes à malária seria de qual raça? Afro-descendente do ponto de vista da doença e branca do ponto de vista da cor da pele? Do ponto de vista da epidemiologia e da genética populacional a confusão seria ainda maior: uma pessoa poderia ser classificada socialmente como negra e não ser geneticamente negra em relação a essa ou daquela doença.

E, se já é difícil classificar os “protótipos” morfológicos das raças (branca, negra, amarela e índia), o que dizer das tentativas de classificação de grupos miscigenados? No Brasil, um país de elevada miscigenação racial, além das quatro raças, existe os subgrupos de mulato (branco + negro), caboclo (branco + índio) e cafuso (negro + índio). E esses subgrupos são de novo divididos em grupos menores, como por exemplo: mulato-claro, mulato-médio, mulato-escuro, amarelo-claro e amarelo-escuro⁽⁴⁵⁾.

Não parece justificável usar traços morfológicos como indicadores de diferenças biológicas entre seres humanos. Na realidade, as variações fenotípicas não são suficientes para dividir a espécie humana em raças porque além esses traços serem determinados por um punhado de genes, eles são resultado de mudanças adaptativas e com a miscigenação tendem a mesclar-se tornando cada vez mais difícil a separação das pessoas em grupos distintos⁽¹⁶⁾.

Vê-se então que apesar da ampla documentação de que variações fenotípicas não se correlacionam com diferenças genéticas, a antropologia física continua a

ser usada até hoje, como método de classificação racial. Ancestralidade:

A ancestralidade geográfica é à base da classificação racial nos Estados Unidos. No Censo de 2000 a população norte-americana foi classificada de acordo com sua ancestralidade geográfica em seis grupos: branco, negro ou afro-americano, asiático, nativo do Hawai ou de ilhas do Pacífico, índio americano ou nativo do Alaska, e outra raça São categorizados como africanos indivíduos com ancestralidade na África subsaariana; caucasianos, aqueles com ancestralidade na Europa, oeste da Ásia (incluindo o subcontinente indiano e o Oriente Médio) e o norte da África (uma vez que a população dessa região deriva principalmente do Oriente Médio e não da África subsaariana); asiáticos são os indivíduos originários do leste da Ásia incluindo China, Indochina, Japão e Filipinas; nativos do Pacífico são aqueles cuja ancestralidade origina-se na Austrália, Papua Nova Guiné, Micronésia e outras ilhas do leste do Pacífico; e americanos nativos são aqueles com ancestralidade indígena na América do Sul ou do Norte⁽⁶⁹⁾.

Essa categorização com base na ancestralidade geográfica é respaldada por estudos de polimorfismos genéticos demonstrando frequências gênicas distintas entre esses grupos o que permite classificá-los nas cinco categorias descritas acima^(23, 90). Entretanto, existem vários problemas na associação de raça ou etnia de um grupo populacional com base na sua ancestralidade geográfica ou continente de origem. Um deles seria que à medida que essas populações se misturam ficou cada vez mais difícil distingui-las: 30% dos norte-americanos que se julgam brancos têm 10% de ancestralidade negra e 12-23% dos negros norte-americanos tem ancestralidade caucasiana⁽⁶⁹⁾. Outro problema seria a amplitude da definição, por exemplo, a Ásia é um continente formado por vários países, línguas, religiões, dietas, etnias e outros fatores relevantes para saúde e doença. Portanto, classificar uma pessoa como asiático é não levar em consideração os vários fatores que os distinguem. A mesma objeção se faz quando o termo asiático é reduzido para chineses, coreanos e vietnamitas; ou quando um queniano e um haitiano são considerados como negros embora não compartilhem

os mesmos hábitos nutricionais, atitudes em relação à saúde e até mesmo herança biológica^(25,80).

No Brasil, a ancestralidade geográfica não é algo que as pessoas saibam responder com clareza. Schwartzman⁽⁷⁸⁾ (1999), aplicaram questionário para verificar a noção de ancestralidade dos brasileiros. Ao serem perguntados sobre sua ancestralidade menos de 10% dos negros responderam África como continente de origem. Quando perguntados sobre sua etnicidade em um questionário que permitia 12 opções diferentes, 86% se identificaram como “brasileiros” mostrando que apesar de ser um país de imigrantes a sociedade brasileira não possui diferenças étnico-culturais acentuadas. Esta dificuldade de determinar a ancestralidade deriva principalmente do fato de que no Brasil a miscigenação teve início logo após o seu descobrimento por Pedro Álvares Cabral. Se esse mesmo questionário fosse aplicado há, por exemplo, 200-300 anos talvez fosse mais fácil para as pessoas responderem sobre sua ancestralidade geográfica.

Apesar dessas dificuldades, tem-se notado recentemente no Brasil um movimento no sentido de abandonar a classificação tradicional de cor para uma com base na ancestralidade. Isto é demonstrado pela tendência de se agrupar sobre o termo negro o indivíduo classificado tradicionalmente como pardo e preto. Além disso, o Ministério da Saúde tem usado em alguns documentos oficiais o termo afro-descendente⁽⁵²⁾. Um problema com esta “mudança” de agrupar pardos e pretos como equivalentes a afro-descendentes já foi detectado por Parra et al.⁽⁵⁷⁾ (2003) ao demonstrar que no Brasil a cor é um pobre preditor de ancestralidade africana.

Autodeclaração

A autodeclaração ou autoclassificação é o método geralmente usado nos Censos Demográficos da maioria dos países onde a classificação racial é registrada, mas diferindo entre eles o critério para definir raça e os seus subgrupos. Nesse caso, as pessoas podem se autodeclarar como pertencentes a um grupo racial de acordo às várias definições.

No Brasil, censos desde 1872 utilizam o critério

fenotípico, de aparência física, na sua metodologia. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), as pessoas têm as opções de se autodeclarar, de acordo com a cor da sua pele, como: branco, preto, amarelo, indígena, pardo e sem declarar. Existe assim, a mistura de cor com etnicidade uma vez que ser indígena não se refere a uma cor específica, podendo ser definida não apenas por traços físicos como também por ancestralidade ou etnicidade⁽⁸⁷⁾. Nota-se ainda que o Censo resume a mistura de todas as raças como “parda” apesar dessa palavra ser raramente usada pelos brasileiros para definir a cor da pele. A palavra preferida para as pessoas categorizadas como pardas definirem sua cor é “moreno”⁽⁸⁷⁾. Outro problema é que no Brasil a definição de cor de pele muda até com a situação que o indivíduo se encontra: ele pode ser negro no carnaval; preto para o IBGE; moreno para os amigos; neguinho na relação afetiva; e negro ou pardo para entrar no sistema de cotas das universidades públicas. Além disso, a autodeclaração muda de acordo com o desejo de ser aceito em um grupo social dominante. É comum o entrevistado “embranquecer” sua cor quando ele quer dar ao entrevistador a impressão de possuir um status sócio-econômico superior⁽⁸⁷⁾. No censo demográfico brasileiro de 2000, com uma população de 169 milhões de pessoas, 53,7% dos brasileiros se declararam brancos, 39,1% se declararam pardos, 6,2% negros, 0,5% amarelos e 0,4% como índios⁽⁸⁷⁾.

Embora o conceito norte-americano solicite a autodeclaração baseada na ancestralidade, as pessoas continuam a serem definidas por caracteres físicos. Ou seja, afro-americano, negro-americano, pessoa de cor ou preto caracterizam um mesmo grupo (o negro) baseado na aparência física. Lá prevalece a “one drop rule” pela qual qualquer pessoa que possua até mesmo uma gota de sangue negro é assim considerada mesmo que a maioria dos seus ancestrais seja branca. No último censo demográfico de 2000, 75% da população norte-americana foi considerada como branca; 12,3% como afro-descendente; 3,6% como asiática; 1% como americanos nativos; 0,1% como nativos das ilhas do Pacífico; 5,5% como pertencentes a “outras raças”; e 2,4% dos indivíduos se declararam como pertencentes a mais de uma raça^(69, 87).

Como se vê o único viés eliminado pela autodeclaração é o de não deixar a critério do entrevistador a decisão de classificar o entrevistado em um ou outro grupo, com exceção da classificação racial usada nos registros de óbitos e nascimentos.

Sobrenomes

Darwin, em 1875, foi um dos primeiros pesquisadores a usar sobrenomes em pesquisas médicas ao estudar frequência de casamentos entre primos na Inglaterra⁽⁸⁾. Desde então, vários estudiosos têm chamado a atenção para o fato de que os sobrenomes podem ser muito importantes nos estudos de populações pela sua analogia com estudos genéticos de associação, por exemplo, com grupo sanguíneo⁽⁸⁴⁾ e isoenzimas^(6, 20, 31). Nas sociedades onde existe uma transmissão patrilinear dos sobrenomes eles podem ser usados como correspondentes aos marcadores genéticos do cromossoma Y⁽⁸⁴⁾. O uso de sobrenomes por ser mais econômico do que o uso de marcadores biológicos permite o estudo de grandes populações a um custo mais acessível⁽⁷⁴⁾. Na América Latina, o uso de sobrenomes para classificação racial foi mais usado porque, de modo geral cada indivíduo herda um ou dois sobrenomes de cada um dos pais o que torna possível a análise de sua ancestralidade⁽⁷⁴⁾. Na Inglaterra, o uso dos sobrenomes foi utilizado para identificação étnica de imigrantes do sul da Ásia na investigação de padrões de mortalidade e fatores de risco para doenças⁽⁵⁴⁾. Os principais problemas encontrados com o uso dessa metodologia são a adoção dos nomes dos seus senhores feudais por parte dos escravos (em sociedades de origem escravocrata), modificação dos nomes dos índios após o batismo (em populações de ancestralidade índia), perda de registros e mutações⁽⁷⁴⁾. Estas limitações não foram observadas em estudos realizados no Brasil por Tavares-Neto & Azevêdo⁽⁸³⁾.

Pesquisas realizadas pelo Laboratório de Genética da UFBA a partir do final da década de 70 demonstraram que os sobrenomes de conotação religiosa eram mais associados com ancestralidade negra, sobrenomes do tipo animal-plantas com

ancestralidade indígena e “outros” sobrenomes com ancestralidade branca^(7, 8, 10-12, 83). A adoção de sobrenomes de natureza devocional pelos negros é explicada pelas suas fortes tradições religiosas e assimilação do cristianismo dos colonizadores portugueses e surgimento de um sincretismo entre santos católicos e deuses africanos, já que eles não podiam adotar as suas próprias práticas religiosas⁽⁹⁾. A adoção de sobrenomes de animal/planta pelos índios também foi resultado de aspectos culturais. Nesses estudos, 25% das pessoas declaradas como brancas no Estado da Bahia tinham nomes devocionais, em comparação com 54% daqueles declarados como negros⁽¹²⁾. Curiosamente, existiam mais nomes de conotação religiosa, no sexo feminino do que no masculino, indicando que os indivíduos vinham adquirindo sobrenomes mais por adoção do que por herança⁽⁸⁾. O Quadro 1, modificado de Tavares-Neto & Azevêdo⁽⁸³⁾, 1977, mostra exemplos de sobrenomes de origem devocional mais frequentes nos indivíduos afros-descendentes da Bahia na década de 70.

Marcadores Biológicos

O principal ponto de discórdia em relação à existência de raças humanas é se existe ou não um conteúdo biológico para classificação racial.

Antes de discutir as evidências se raça tem ou não um marcador biológico que possa dividi-la em diferentes grupos é importante rever os conceitos de genótipo e fenótipo para o melhor entendimento da argumentação. Genótipo são os atributos individuais decorrentes da herança de genes contidos no ovo fecundado, sendo metade oriundos da mãe e metade oriundos do pai. Fenótipo é o modo pelo qual o genótipo se manifesta, sendo fortemente influenciado pelas condições ambientais⁽¹³⁾.

Duas teorias diametralmente opostas existem em relação à raça e biologia. A primeira diz respeito à inexistência de raças distintas, sendo aquilo que chamamos de raça, a expressão fenotípica diferente de um mesmo genótipo⁽⁴⁸⁾. Ou seja, as características fenotípicas a qual damos o nome de raça nada mais são que adaptações genéticas de populações com

Quadro 1. Sobrenomes de conotação religiosa, ou devocional, mais freqüentes no estado da Bahia (1977).

Sobrenomes				
Aflitos	Bispo	Evangelista	Piedade	Santa Rita
Ajuda	Boa Morte	Hora	Prazeres	Santiago
Amor Divino	Bomfim	Jesus	Purificação	Santos
Amparo	Cardeal	Luz	Ramos	São Pedro
Anjos	Carmo	Mercês	Reis	Socorro
Anunciação	Chagas	Natividade	Ressurreição	Soledade
Arcanjo	Conceição	Nascimento	Rosário	Trindade
Assis	Cruz	Paixão	Sacramento	Virgem
Assunção	Encarnação	Palma	Santana	Virgens
Batista	Espírito Santo	Passos	Sant'Anna	Xavier

Fonte: Tavares-Neto & Azevedo, 1977.

modificações na freqüência e ocorrência de certos genes com o objetivo de manter a sobrevivência da espécie. A segunda teoria argumenta que se a pessoas herdaram genes (modificações no substrato genético), que lhes conferem características físicas diferentes, elas também podem herdar genes com atributos de aumentar a proteção ou susceptibilidade para certas doenças ⁽⁶⁹⁾. Sendo isto possível de ser definido biologicamente viria a ter grande importância no estudo das doenças.

Um dos principais problemas em associar raça com substrato biológico foi apresentado por Kaufman & Cooper ⁽⁴³⁾ em 2001. Citam esses autores que os estudos de Biologia Molecular embora tentem dar base objetiva para diferenças raciais e étnicas ao confundirem validade com predição incorrem em graves erros. Isto é, os pesquisadores iniciam seus estudos selecionando grupos de indivíduos que se auto-identificam como pertencentes a determinado grupo racial ou étnico e a partir daí procuram traços físicos ou moleculares que possam prever a classificação previamente adotada. Ou seja, o padrão contra qual eles são comparados é de natureza subjetiva. Desse modo, ao invés de validar a entidade biológica denominada de raça esses estudos apenas predizem quão freqüentemente as pessoas que se definiram como pertencentes a um grupo na realidade pertencem a ele. Ou seja, a maioria dos estudos de variação em humanos tem início com a amostragem e seleção de

populações pré-definidas. Isto é geralmente feito com base na cultura e geografia o que pode não refletir relação com diferenças genéticas. Portanto, não fica claro se a ancestralidade relatada pelo paciente é equivalente à ancestralidade aferida geneticamente. Isto é ainda mais difícil de ser estudado em populações muito miscigenadas como a do Brasil ⁽⁷⁰⁾.

Existem pelo menos 15 milhões de polimorfismos genéticos, e a modificação de apenas um par de bases é suficiente para causar doenças como a falcemia ⁽²⁴⁾. Então quantas modificações e quais seriam necessárias para diferenciar genotipicamente duas populações uma vez que apenas 0,012% da variação do material genético em humanos pode ser atribuído a diferenças raciais ⁽⁴⁴⁾? Lewontin ⁽⁴⁶⁾, em 1972, estudando polimorfismos genéticos mostrou que a maior variação genética era encontrada entre indivíduos de uma mesma população (85,4%), seguida por populações dentro de uma mesma raça (8,3%) e que apenas uma pequena variação genética existia entre populações de raças diferentes (6,3%). A cor da pele é a única exceção a essa afirmativa, uma vez que para esse traço morfológico a variação entre regiões geográficas é de 88% enquanto a variação dentro de uma mesma região é de apenas 12% ⁽⁶⁸⁾.

Os principais marcadores biológicos usados no estudo da raça em humanos foram os grupos sanguíneos do sistema ABO ^(55, 84); proteínas e isoenzimas como, G6PD ⁽²¹⁾, hemoglobinas ⁽⁷²⁾,

desidrogenase alcoólica humana ⁽⁶⁾ e colinesterase sérica ⁽⁶⁴⁾. Mais recentemente, as técnicas de biologia molecular permitiram um maior detalhamento do genoma humano ⁽²⁶⁾.

O primeiro trabalho publicado no Brasil usando marcador biológico para estudo de raça foi realizado por Saldanha ⁽⁷¹⁾, em 1962, onde ele demonstrou que negros em São Paulo possuíam em média 50% de genes de brancos.

Na Bahia, Azevêdo ⁽¹³⁾ mostrou que o grupo sanguíneo O era mais prevalente nos negros, o grupo A mais freqüente nos brancos e freqüências intermediárias para o grupo A e B para mulatos.

Os métodos de Biologia Molecular podem ser divididos em dois grandes grupos: estudos de polimorfismos uniparentais e estudos de polimorfismos presentes em cromossomos autossômicos. Os polimorfismos uniparentais são bons marcadores de linhagens porque não existe troca de genes entre os segmentos genômicos e os genes transmitidos para as próximas gerações não se modificam nas matrilineagens e patrilineagens a não ser quando ocorre uma mutação ⁽⁵⁹⁾. Por sua vez, O DNA mitocondrial avalia a contribuição materna e as regiões do cromossoma Y avaliam a contribuição paterna ⁽⁵⁹⁾. Apesar de não sofrerem recombinação os problemas mais associados com o uso desses marcadores são mutações, não conhecimento da sua freqüência em diferentes populações e dificuldade em encontrar um marcador que seja restrito a população ⁽⁷⁴⁾. Estudos do polimorfismo Y em brasileiros brancos mostraram pequena contribuição de cromossomos Y típicos da África revelando que a maioria da patrilineagem brasileira é de origem européia ⁽²⁸⁾. Estudos do DNA mitocondrial em brasileiros brancos mostraram 33% das linhagens como sendo de origem ameríndia, 28% como africana e 39% européia ⁽²⁾. Quando estratificado por regiões do país, observou-se, como esperado, que a maioria das matrilineagens no Norte era de origem ameríndia (54%), a maioria das linhagens mitocondriais no Nordeste era de origem africana (44%) e a maioria das linhagens maternas no Sul era de origem européia (66%). Isso corrobora as

diferentes contribuições das três populações parentais na formação do povo brasileiro.

Os polimorfismos presentes em cromossomos autossômicos são bons marcadores de individualidade, se a diferença na freqüência alélica entre as duas populações parentais for grande ⁽⁵⁹⁾. Parra et al. ⁽⁵⁷⁾ (2003) estudaram marcadores genéticos autossômicos para determinar o índice de ancestralidade africana (IAA) em brasileiros. A definição de afrodescendente foi arbitrariamente estipulada como um IAA superior a 10%. Nesse estudo, 75% dos brancos no Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil apresentavam IAA superior a 10% quando comparados a 49% dos brancos no sul do país, e a 11% dos brancos nos Estados Unidos ⁽⁵⁹⁾. Curiosamente, 27% das pessoas classificadas como pretas não possuíam a ancestralidade africana como majoritária. Isto mostra que os traços físicos são pobres marcadores de ancestralidade geográfica em populações de grande mescla gênica.

As técnicas mais usadas para realizar esses estudos são os marcadores de polimorfismo *Alus* ou microsatélite, marcadores de nucleotídeos simples (*single nucleotide polymorphism – SNP*), polimorfismos de repetições pequenas em “tandem” (*short tandem repeats*) e polimorfismos nas seqüências de pares de bases. De modo geral, esses marcadores não possuem nenhuma função genética conhecida. São variações neutras que não codificam elaboração de proteínas os quais se replicam ocasionalmente, inserindo-se aleatoriamente no mesmo cromossoma ou em outros cromossomas onde podem permanecer por eras, sendo transmitidos de uma pessoa para seus descendentes. Porque ocorrem em regiões não-codificadoras são menos afetados por processos de seleção natural refletindo com mais acurácia a história da evolução humana ⁽⁹³⁾. Portanto, se duas pessoas tem o mesmo marcador provavelmente descendem de um ancestral comum que lhes transmitiu aquele segmento específico do DNA. Assim, quanto maior o número de *loci* microsatélite autossômicos melhor será a capacidade de estudar diferenças populacionais.

Como visto acima, o seqüenciamento do genoma humano mostrou que existem milhões de polimorfismos. A maneira ideal de distinguir duas populações seria encontrar um alelo que estivesse fixo em um grupo e ausente no outro ⁽¹⁷⁾. Mas devido a grande disseminação de alelos, as diferenças entre populações humanas derivam mais da gradação entre frequências alélicas do que de genótipos distintos. Isto quer dizer que não existem alelos específicos que possam distinguir um branco de um negro; o que ocorre na realidade são diferenças na prevalência de alelos presentes entre as diversas populações estudadas ⁽⁷⁷⁾. Com isto não se nega o fato de que a frequência de certas variantes alélicas seja mais comum em determinados grupos que compartilhem a mesma ancestralidade geográfica ou cultural, por exemplo, hemoglobinopatia S em pessoas de ancestralidade africana e fibrose cística em descendentes de europeus ⁽⁷⁷⁾. Desse modo, a diferente distribuição dos polimorfismos permite estudar a história e efeitos da seleção natural sobre um povo. Porém essas diferenças não permitem definir raça e sim, ancestralidade.

Apesar disso, algumas classificações assumem que existe um agrupamento de traços biológicos em populações de humanos que as fazem se diferenciar geneticamente uma das outras e que traços fenotípicos como cor da pele podem ser usados como “marcadores clínicos” dessas diferenças ⁽⁴³⁾. Mas, será que as características físicas conseguem transmitir uma informação confiável sobre a constituição genética de uma pessoa além de dizer que ela possui olhos azuis e cabelos lisos?

Ao invés de usar estudos de polimorfismo genético para buscar diferenças raciais os investigadores deveriam investigar variações genéticas e mutações relevantes para a causa e patogenia de doenças ⁽⁷⁷⁾.

Populações Racialmente Miscigenadas

As populações mundiais já estão bastante miscigenadas ou estão em processo de se tornarem como tais. A cada dia a miscigenação aumenta entre grupos humanos não só de raças como de grupos étnicos

diferentes. Com isso, a classificação racial que já é difícil em populações mais ou menos isoladas fica ainda mais falha quando os indivíduos são miscigenados e fenotípicamente intermediários.

Um exemplo dessa miscigenação é a população brasileira, uma das mais heterogêneas do mundo, resultado de 500 anos de acasalamento de pessoas de três continentes (europeus, africanos e ameríndios). No Brasil, esta mistura racial deu origem a grupos classificados como mulatos, originados da mistura de brancos com negros; cafusos, resultante da mistura de negros com índios, e caboclos, produto da mistura de brancos com índios. Não fosse a dificuldade de classificar estes grupos, existem autores que recomendam uma subclassificação, por exemplo, dos mulatos em mulato-claro, médio e escuro; e de índios, em claros e escuros ⁽⁴⁵⁾. Como então definir as categorias raciais em países com acentuada miscigenação? Por exemplo: uma pessoa de cor branca, olhos azuis e cabelos lisos, mas portadora de anemia falciforme poderia ser classificada como branca se o critério usado fosse o fenótipo, ou poderia ser caracterizada como de ancestralidade negra se o critério fosse a herança da variante falcêmica. Qual dos dois critérios usar? Como saber se alguém com fenótipo de mulato não possui ancestralidade índia, ou alguém com fenótipo de negro não possui ancestralidade européia? O que difere um mulato-claro de um mulato-médio? Como aferir o genótipo através do fenótipo em populações miscigenadas? Ainda citando como exemplo o Brasil, não se pode falar de uma população geneticamente brasileira, uma vez que a miscigenação tri-tracial fez com que determinados subgrupos predominassem em proporções variadas em regiões diferentes do país (*e.g.*, mulatos predominam no Nordeste, especialmente no Estado da Bahia e caboclos predominam na região Norte, especialmente no Estado do Amazonas). No Brasil, vários estudos têm demonstrado que a extensão da mistura gênica nesses últimos 500 anos é muito maior do que o comumente avaliado por critérios morfológicos ⁽⁵⁷⁾. Isso faz com que estudos de classificação racial e de susceptibilidade genética não possam ser extrapolados até mesmo entre diferentes regiões de um mesmo país (*e.g.*, estudos de distribuição de alelos HLA).

Usando outro exemplo, dessa vez de uma população pouco miscigenada como a norte-americana, observa-se que as pessoas são categorizados em apenas 5 grupos raciais de acordo com sua origem geográfica ou ancestralidade (brancos, negros ou afro-americanos, asiáticos, índios americanos ou nativos do Alaska, e nativos do Hawai ou ilhas do Pacífico). Esta classificação é usada sob a argumentação de que a maior força influenciadora da diversidade genética entre humanos foi a geografia e que a distância física imposta por barreiras geográficas fez com que populações mantivessem um padrão endogâmico resultando em subgrupos populacionais. Mesmo lá, estudos genéticos têm demonstrado que 7-20% dos negros norte-americanos tem algum grau de mistura com brancos ⁽²⁴⁾. Algumas projeções mostram que em 2050 50% dos americanos serão “não-brancos” em comparação com os 75% do Censo de 2000 ⁽⁵⁰⁾.

Como visto, a proporção e o grau de mistura racial varia de acordo com o país e dentro do mesmo de acordo com a região e dentro da mesma de acordo com a localidade ⁽⁷⁵⁾. Essa dificuldade de classificação racial, principalmente em populações miscigenadas, só reforça a posição de antropólogos e geneticistas quanto à inexistência de raças humanas biologicamente distintas e que o conceito atual da palavra raça não passa de uma definição sócio-cultural.

Raça e Etnia

Raça não pode ser confundida nem pode ser usada como sinônimo de etnia. Grupos raciais se originaram de separação geográfica imposta por barreiras físicas (oceanos, montanhas) enquanto grupos étnicos surgiram dentro desses grupos raciais devido a diferenças na religião, tradição cultural e/ou lingüística. Apesar disso, algumas pessoas usam os dois termos como se fossem sinônimos (evitando o uso do termo raça para ser “politicamente” correto), outras utilizam o termo “raça /etnia” para descrever ambas as variáveis e outras chegam a criar um novo termo chamado “etnoraça” ⁽⁴³⁾.

Enquanto raça é habitualmente definida com base em características físicas, origem geográfica ou herança biológica comum; etnia é um conceito que incorpora variáveis sociais, culturais, religiosas, lingüísticas e dietéticas para identificar pessoas e populações ⁽⁹¹⁾. Como as fronteiras étnicas são imprecisas e dinâmicas, definir populações de origem multiétnica ou multiracial em países formados por diferentes imigrantes é muito difícil. É preciso que haja uma clara definição desses termos nas pesquisas médicas, genéticas e epidemiológicas uma vez que as mesmas dificuldades classificatórias ocorrem tanto para raça como para etnia.

Algumas publicações médicas têm abandonado o conceito de raça e usado informações sobre influências étnicas e familiares para o estudo das doenças, principalmente no campo da epidemiologia. A informação sobre etnia pode ser muito útil para o pesquisador quando são obtidas informações sobre origem geográfica, padrão migratório, moradia, preferências alimentares, fatores culturais, ambientais e ancestralidade. Entretanto, o que se nota em grande número de artigos é o uso impreciso desse termo. Por exemplo, não se pode classificar hispânicos como um grupo étnico, porque eles são formados por dezenas de grupos com tradição cultural e hábitos de vida bastante diferentes que só têm em comum o fato de falarem o mesmo idioma. Também não se pode confundir etnia com nacionalidade.

É imprescindível que exista rigor metodológico na definição de etnia para que os estudos científicos na área biomédica tenham validade e possam ser comparados.

Raça e Racismo

O mundo racial foi inventado para dar a alguns grupos o status de dominantes, superiores e com direito “inato” a ser favorecido pelos privilégios do poder, educação, saúde e dinheiro ⁽³⁾.

O conceito moderno de raça surgiu com os colonizadores europeus que escravizaram os negros por mais de 400 anos a partir de início do século XVI e inventaram as categorias de “branquitude” e “negritude” para justificar sua política de opressão e

exclusão, na qual os brancos eram considerados superiores e os negros, inferiores. E foi com muita relutância que os colonizadores ingleses estenderam esta prerrogativa para outros europeus de modo a ganhar apoio na sua política de controle dos escravos africanos ⁽¹⁶⁾. Aos negros foram negados os mais elementares direitos civis, enquanto aos brancos foram reservadas “todas as vantagens econômicas e sociais que lhes fizeram ser donos das terras, do poder e do acesso à educação” ^(14, 15).

Sob a ótica do racismo, durante a II Guerra Mundial os nazistas exterminaram mais de 11 milhões de pessoas de raças “inferiores” (judeus, ciganos, africanos, etc) no que vem a ser conhecido como o Holocausto ⁽³⁾.

Em vários países do mundo e até mesmo no Brasil, apesar da pretensa “democracia racial”, o preconceito baseado na aparência física ainda existe ⁽⁵⁷⁾. Isto quer dizer que a pigmentação da pele continua a ser usada como mecanismo de exclusão e de preconceito racial, apesar de todas as evidências fornecidas pela genética de que a cor da pele é determinada por 4-6 genes que não exercem nenhuma influência sobre as outras habilidades do indivíduo. É o chamado preconceito de “marca” para se contrapor ao preconceito de “origem”. No primeiro grupo, as pessoas são segregadas com base na aparência física, exemplo do Brasil, enquanto no segundo as pessoas são segregadas de acordo com a percepção a qual grupo étnico elas pertencem ⁽⁵⁹⁾.

Na sociedade brasileira há exclusão socioeconômica de certos grupos populacionais, sendo esta exclusão mais evidente nos negros ⁽⁵⁹⁾. Atualmente o “embranquecimento” (“*whitening*”) tem sido o processo pelo qual, no Brasil, os mais escuros conseguem melhores oportunidades sociais ao “diluir o sangue negro no branco” para tornar-se mais claro e mais aceito ⁽⁸⁷⁾. Algumas pessoas chegam a dizer que no Brasil o “dinheiro embranquece” (“*money whitens*”). Pessoas de pele escura, mas, de nível sócio-econômico elevado tendem a se classificar como em categorias de cores mais claras ⁽⁸⁷⁾. Esse fenômeno é oposto ao dos Estados Unidos onde o processo de “purificação” se faz pela diminuição dos casamentos inter-raciais proibidos por lei até 1967 ⁽⁸⁷⁾.

Para saldar essa dívida social, vários países, inclusive o Brasil, têm desenvolvido políticas de ações afirmativas como forma de reparação social para com os grupos populacionais historicamente alijados das mesmas oportunidades de crescimento. Uma das mais recentes tem sido a implementação do sistema de reserva de cotas nas vagas das universidades públicas brasileiras. Após a adoção do sistema de cotas pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) em 2001, várias outras instituições públicas de ensino superior tomaram a mesma iniciativa, sendo a decisão mais recente feita pela Universidade Federal da Bahia (UFBA) no seu vestibular de 2005. Dois aspectos diferenciam esse programa nas diferentes universidades. O primeiro é a porcentagem de vagas a serem reservadas e o segundo é que critério de elegibilidade usar. A quantidade de vagas a ser reservada deriva de dados do IBGE sobre a porcentagem de “pretos e pardos” existentes naquela cidade, região ou Estado. Já o critério de seleção, reacendeu a discussão sobre raça e cor no Brasil ⁽⁶³⁾. Como definir quem é negro ou quem é afro-descendente em um país tão miscigenado? Quem são os descendentes da escravidão? As definições usadas variam desde a autodeclaração como “preto ou pardo” (critério morfológico de cor), a uma declaração de afro-descendência (critério de ancestralidade), até ao esdrúxulo critério fotográfico da Universidade Federal do Mato Grosso, que usa um comitê para julgar o “grau” de “negritude ou africanalidade” baseado em um “fenótipo” de características faciais que inclui possuir lábios grossos, nariz chato e cabelo pixaim ⁽⁵⁹⁾.

Como essas políticas de reparação social ainda estão engatinhando e como o preconceito, seja fenotípico ou econômico, continua a ser perpetuado na família, na mídia e nas escolas, o racismo persiste no mundo atual como uma forma de escravidão moderna ⁽¹³⁾.

Raça e Medicina

A divisão do *Homo sapiens* em 3-6 classificações raciais teve início no século 18 bem antes do estabelecimento da Genética e da Biologia ⁽⁸⁹⁾. Desde então, essas disciplinas mostraram que não existe base

biológica para raça. Apesar disso, a raça foi “medicalizada” e a taxonomia racial continuou a ser usada em medicina como uma variável de importância fundamental para estudar as bases diagnósticas e terapêutica das doenças ⁽⁹¹⁾.

A falta de uma definição clara do que seja raça e da sua real importância na prática, ensino e pesquisa biomédica tem dificultado o seu uso. Isso é demonstrado pela diversidade de classificações raciais encontradas nos principais livros, dicionários e enciclopédias médicas ⁽⁹¹⁾. Por exemplo, um livro médico classifica raça por critério cromático em “brancos, negros, amarelos, vermelhos e marrons” ⁽⁷⁶⁾, enquanto outro usa como critério diferenciador aspectos físicos como estatura, cor da pele, formato da cabeça ⁽⁷⁹⁾. Como a utilização dos termos é inconsistente as pessoas são alocadas em cada grupo de forma arbitrária.

A classificação usada na prática clínica é na sua maioria uma classificação fenotípica. Como a aparência de uma pessoa é determinada por um pequeno número de genes não é possível fazer inferências sobre sua constituição genética com base em traços oligogênicos e que sofreram e sofrem forte influência adaptativa e ambiental. Assim, a classificação baseada nesse critério não tem a menor utilidade do ponto de vista médico. Às vezes uma enfermidade é “retirada” da lista de prováveis suspeitas diagnósticas com base apenas na cor do paciente (*e.g.*, não pensar em falcemia em uma pessoa de cor branca); outras vezes não se amplia o leque de suspeitas diagnósticas baseando-se apenas na cor do paciente (*e.g.*, não pensar em outras causas de anemia, que não a falciforme, quando avaliando uma pessoa negra com anemia hemolítica).

Uma das poucas situações em que raça definida pela cor da pele tem importância médica é em dermatologia. O carcinoma baso-celular é extremamente raro em negros, quelóides são pouco frequentes em brancos e as indicações de dermatoterapia com laser são muitas vezes definidas pela quantidade de melanina da pele ⁽²⁷⁾. Apesar da colorimetria ajudar a diferenciar objetivamente os vários tipos de cor de pele, a descrição clínica ainda é um método muito mais fácil, de custo reduzido e de aplicação universal ⁽²⁷⁾.

A classificação racial na pesquisa médica e epidemiológica também sofre a influência do local onde o trabalho é realizado. Como nos Estados Unidos o padrão utilizado é a ancestralidade uma pequena influência de origem africana é suficiente para alguém ser classificado como negro (“*one drop rule*”). Assim, uma pessoa classificada como “negro” nos Estados Unidos pode ser classificado como “branco” no Brasil, e alguém classificado como “branco” no nordeste do Brasil pode ser classificado como “mulato” no sul do país.

Em algumas pesquisas são considerados como equivalentes raciais: branco, caucasiano, anglo e europeu; negro, preto e africano; asiáticos e amarelos; e hispânicos e sul americanos ⁽⁹¹⁾. Isso só faz aumentar a confusão. Ou seja, um tipo de classificação faz uso da cor da pele como critério de classificação racial (branco, preto, amarelo); outro critério usa a ancestralidade geográfica (caucasiano, europeu, africano) e o outro critério usa um conceito lingüístico (anglo, hispânico). Vários são os problemas gerados por esta mistura de classificação. Não é possível usar como sinônimos os termos branco/caucasiano/europeu/anglo, porque a cor da pele não se iguala à ancestralidade ou a etnia ⁽⁵⁷⁾. Do mesmo modo, a origem geográfica não permite definir uma população específica, pois essas regiões são formadas por centenas de grupos diferentes; e grupos lingüísticos não podem ser classificados como raça ou mesmo como grupos étnicos porque a maioria deles contem inúmeras etnias ⁽⁹¹⁾.

A categorização se torna ainda mais complexa quando os trabalhos científicos não descrevem na sua metodologia os critérios utilizados para estabelecer as diferentes categorias raciais ou étnicas.

Assim, a literatura médica mistura no seu dia-a-dia conceitos de raça, etnicidade e grupo lingüístico não permitindo ao leitor saber como extrapolar os dados para a sua própria realidade. Os resultados das pesquisas são difíceis de serem comparados e podem levar como resultado dessa dificuldade a elaboração de hipóteses inapropriadas ou a discussões sem sentido ⁽⁵¹⁾.

Em janeiro de 2003, a Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (FDA) recomendou a coleta de dados raciais em todos os testes clínicos,

para avaliar a inclusão de grupos minoritários nas pesquisas financiadas por verbas federais, uma vez que a maioria delas incluía predominantemente pessoas de raça branca ⁽⁷⁷⁾.

O uso continuado de raça na literatura médica tem legitimado sua aplicação no sentido de classificar pessoas e fazer inferências acerca de sua saúde. Ao estudar a matéria Introdução ao Exame Clínico, a maioria dos estudantes é ensinada a iniciar seu relato de caso com a descrição do nome, sexo, idade e raça do paciente ⁽⁸⁰⁾. Os prontuários, as visitas à enfermagem, os relatos de caso, as publicações científicas e as pesquisas continuam a classificar os pacientes em termos de raça. Alguns pesquisadores a utilizam para avaliar como as doenças e as respostas terapêuticas são influenciadas por fatores sociais tais como acesso a serviços de saúde (raça como um construto social), enquanto outros a usam para manter a teoria dominadora da superioridade racial baseada em critérios biológicos ⁽²⁷⁾. Embora o conceito de raça continue permeando todo ato médico, a maioria das pessoas não sabe bem o porquê de a estarem usando.

Em resumo, apesar da noção de não existir diferentes raças humanas ^(16, 48), essa variável continua a ser usada de forma inconsistente para estudos de prevalência e gravidade de doenças; resposta ao tratamento (farmacogenômica); identificação de fatores de risco; indicação de testes diagnósticos para tratar doenças com fatores genéticos conhecidos e estudos de acesso e uso dos serviços de saúde.

Raça e Doenças

Um grande número de pesquisas biomédicas demonstra diferenças raciais na causa, expressão e prevalência de várias doenças, apesar da categorização racial não poder estimar o risco de uma determinada enfermidade com a mesma precisão que fatores de risco causais como tabagismo e câncer ^(69, 76). Questiona-se até que ponto, o uso de raça deve ser considerado em estudos de doença ou como variável útil para auxiliar a prática médica.

Raça versus Doença versus Fenótipo

Uma das poucas situações em que raça, classificada fenotipicamente, tem importância médica é em dermatologia. Pessoas de pele clara têm risco maior de câncer da pele que pessoas de pele escura. A cor da pele também está biologicamente associada à resposta inflamatória da pele, formação de quelóides e resposta terapêutica ao laser ⁽²⁷⁾.

Raça versus Doença versus Classe Social

O status sócio-econômico tem sido considerado por diversos investigadores como variável de confusão quando se pretende analisar a relação entre raça e doença. A sua relação com raça é evidenciada nos grupos minoritários pelas maiores taxas de morbidade e mortalidade, menor expectativa de vida, menor facilidade de acesso a serviços de saúde, menor taxa de saneamento básico nas suas moradias e menor renda familiar. Isto leva a diferenças importantes na incidência de doenças e na resposta ao seu tratamento ⁽⁹²⁾.

As desigualdades socioeconômicas existentes entre brancos, negros e mulatos são equivalentes a sua maior ou menos ancestralidade negra, onde os negros constituem o grupo menos favorecido ⁽¹⁵⁾.

Nos Estados Unidos da América do Norte, inúmeros estudos sobre desigualdades raciais e saúde mostram que as diferenças quase sempre se reduzem e às vezes são eliminadas após ajustes para o nível sócio-econômico. No Brasil, os poucos estudos sobre o tema também mostram que a variável raça deixa de ser um fator importante quando ela é ajustada para o status sócio-econômico ⁽⁸⁷⁾. Barros et al. ⁽¹⁹⁾ (2001), estudando crianças negras no sudeste do Brasil, mostraram que elas tinham maior prevalência de baixo peso e prematuridade ao nascer, pior situação nutricional no primeiro ano de vida e que suas mães receberam cuidados pré-natais de qualidade inferior ao grupo de comparação. Essas diferenças foram reduzidas após correção para o estado sócio-econômico.

Portanto, o status sócio-econômico é fortemente associado com raça e etnia e um bom indicador de acesso a serviços de saúde e educação, que por sua

vez são associados à diferença na incidência de doenças e resposta terapêutica⁽²⁴⁾. Embora os grupos minoritários sejam os mais prejudicados, nada impede que um grupo considerado como privilegiado (branco de origem européia) não possa viver na mesma situação de pobreza e necessitar de cuidados diferenciados. Esses fatos devem ser levados em consideração nas pesquisas epidemiológicas para identificar as variáveis sócio-demográficas que possam explicar as diferenças de saúde em grupos populacionais distintos.

Raça versus Doença versus Genótipo

Vários estudos relatam diferenças na frequência de certas doenças em relação à raça e tentam atribuir a isso uma explicação baseada no genótipo. Mas, o que se sabe é que nenhuma doença genética é restrita a determinado grupo populacional, o que varia é a sua frequência.

Nas doenças mendelianas, a relevância de raça e etnia é aparente. Mutações com frequência menor que 2% são quase sempre raça-específicas, mutações com frequência entre 2-20% são mais prevalentes dentro de um grupo racial ou étnico e ausente em outros, mas não são consideradas raça-específica, e doenças mais complexas como o diabetes melito parecem ter uma etiologia multifatorial envolvendo fatores genéticos e ambientais⁽²⁴⁾.

Para doenças complexas, como o diabetes melito tipo 2, não é possível se avaliar o risco ou susceptibilidade baseando-se em genótipo porque não são conhecidos os genes ou combinações gênicas responsáveis por tal risco. Isto só é possível para doenças monogênicas, nas quais a mutação de um único gene é suficiente para causar a doença⁽⁶¹⁾. A maioria das doenças complexas parece ter sua origem nos hábitos e condições de vida⁽³⁸⁾.

Outras vezes o componente genético é resultado de fatores ambientais que agem durante séculos influenciando a distribuição geográfica das doenças. Por exemplo, estuda-se a hipótese de que a maior prevalência do gene da anemia falciforme seja resultado da seleção dessa mutação no continente africano como forma de proteção dos indivíduos heterozigotos contra formas graves da malária falciparum. Outro exemplo

seria a maior prevalência de fibrose cística no continente europeu como resultado de um processo seletivo no qual os indivíduos portadores da forma heterozigótica eram menos propensos a desenvolverem formas graves de cólera. Quando a pessoa herda o “traço” ou a forma heterozigota é protegida e quando herda as duas cópias, desenvolve a doença.

Por outro lado, a diferente prevalência de doenças raras, como Tay-Sachs, não correspondem às grandes categorias raciais, se sim, a grupos étnicos com elevada taxa de endogamia que perpetuam mutações deletérias. A doença de Tay-Sachs, por exemplo, é mais prevalente em judeus sejam eles brancos ou não-brancos⁽³⁴⁾.

É descrito maior risco de brancos desenvolverem a forma grave da esquistossomose mansônica (hipertensão portal e pulmonar) quando comparados a negros mesmo quando variáveis socioeconômicas são controladas^(22, 62, 85). Especula-se que, como a esquistossomose tem origem na África subsaariana a exposição durante séculos teria contribuído para selecionarem negros a serem mais resistentes às formas graves da doença embora nenhum marcador genético ou biológico tenha sido identificado.

Outros polimorfismos genéticos influenciam a susceptibilidade a várias doenças. O polimorfismo do receptor CCR5 é um exemplo⁽⁵⁸⁾. As pessoas que não produzem esses receptores são mais resistentes à infecção pelo vírus HIV porque não há receptor viral nas células do hospedeiro⁽⁵⁸⁾. Esse polimorfismo é encontrado quase exclusivamente em populações do nordeste da Europa. Outros polimorfismos desse receptor alteram o ritmo e a progressão da doença.

Até que o avanço da genética permita possibilidade de prever risco e tratamento de doenças de acordo com o perfil genético de cada pessoa (medicina personalizada) tudo leva a crer que raça continuará a ser usada para inferir genótipo através do fenótipo⁽⁶¹⁾.

Raça versus Doença versus Meio Ambiente

Além do nível sócio-econômico, aspectos culturais e ambientais também são apontados como determinantes não-genéticos para diferenças raciais na

susceptibilidade para doenças. Estudos de migrantes têm demonstrado alteração ou manutenção das diferenças para propensão a enfermidades entre membros de um mesmo grupo racial/étnico residindo em diferentes ambientes. Por exemplo, a taxa de câncer de mama em mulheres asiáticas é menor do que em mulheres brancas norte-americanas. Entretanto, mulheres de ancestralidade asiática residindo nos Estados Unidos apresentam taxas de câncer de mama semelhante às mulheres brancas norte-americanas, sugerindo uma influência ambiental e não-racial^(81,94). Outro estudo mostra que a incidência de doença cardíaca em afrodescendentes morando nos Estados Unidos é maior do que em grupos semelhantes residindo na África o que mais uma vez prediz a favor de fatores ambientais modificando a expressão da doença⁽³³⁾. Porém, nem sempre as diferenças raciais podem ser explicadas por migração. Asiáticos têm uma maior taxa de esclerose múltipla do que caucasianos, e esta diferença persistiu quando foram analisadas pessoas de ancestralidade asiática residindo no Canadá, sugerindo possível fator genético implicado na sua etiologia⁽⁶⁹⁾.

Portanto, é preciso cautela quando da realização de estudos de imigrantes e sua relação com indicadores de saúde porque as diferenças observadas podem ser devido a fatores não aparentes na metodologia, como por exemplo: variações nas taxas de detecção, estimativas inadequadas do número de doentes (numerador) e da população de risco (denominador) e pelo fato de que imigrantes podem ter características próprias que os diferem do grupo que permaneceu em seu país de origem.

Raça e Farmacogenômica

A farmacogenômica no seu sentido mais amplo visa ao desenvolvimento de uma medicina personalizada baseada no fato de que variações gênicas podem influenciar a indicação, posologia, eficácia, efeitos colaterais e resposta terapêutica a determinada droga. Com isso, a terapia seria prescrita de acordo com perfil genético enzimático de cada indivíduo no que se refere

ao metabolismo de drogas e tratamento de tumores. Um exemplo é a menor capacidade de chineses metabolizarem narcóticos devido aos menores níveis da enzima CYP2D6, o que os faz necessitar de dose menores para obter o mesmo efeito terapêutico⁽⁸⁸⁾. Outro exemplo é a variante genética da NAT2 (N-acetiltransferase 2), enzima envolvida no metabolismo de certos medicamentos e detoxicação de carcinógeno, o que permite dividir as pessoas, de acordo com a rapidez com que metabolizam o medicamento, em dois grupos: acetiladores-lentos e acetiladores-rápidos. Embora a frequência de acetiladores-lentos varie em grupos com diferentes ancestralidades (14% asiáticos, 34% afros-descendentes e 54% caucasianos) isso não os atribui alguma característica racial, uma vez que pessoas de qualquer desses grupos pode ser um acetilador- lento embora com probabilidades diferentes⁽²⁴⁾. Seguindo essa mesma linha de raciocínio, seria um contra-senso modificar a dose do medicamento para pessoas pertencentes a um dos grupos tomando como referência a frequência populacional do mesmo. Isso seria o mesmo que excluí-las do benefício da terapia com base em um conceito errôneo de medicina étnico-racial.

Embora a frequência de polimorfismos de enzimas que metabolizam algumas drogas sejam diferentes entre alguns grupos populacionais elas não possuem validade para serem usadas na prescrição de terapia “raça-específica”. Raça pode ser usada com auxiliar na decisão de investigar mutações que estão mais presentes em determinadas populações, como por exemplo, mutação na linhagem de células germinativas BRCA1 e câncer de mama em mulheres judias Ashkenazi⁽⁷⁷⁾, mas isso não quer dizer que raça pode ser usada para prever a presença ou ausência de uma variante alélica responsável por um determinado resultado terapêutico⁽³⁴⁾.

Mesmo que a frequência de certos substratos biológicos seja diferente em grupos populacionais distintos, isso não pode ser associado à raça uma vez que a autodeclaração (método mais usado para classificação racial) é uma variável subjetiva que faz parte da consciência subjetiva de cada indivíduo⁽⁴³⁾. Por outro lado, não se pode gerar hipóteses biológicas quando a variável usada é socialmente ou politicamente

determinada⁽⁵¹⁾. É comum que indivíduos com fenótipo mais semelhante a uma raça se declarem como pertencentes à outra, além do que em países, como nos Estados Unidos, pessoas com uma pequena contribuição de ancestralidade africana sejam consideradas como negras^(35,49).

Para completar esse raciocínio, do ponto de vista biológico apenas 0,012% da variação racial entre humanos pode ser atribuída ao material genético⁽⁴⁴⁾ e as noções comuns de raça nem sempre refletem a composição gênica da pessoa: 30% dos norte-americanos que se consideram brancos têm menos de 90% de ancestralidade européia⁽⁶⁹⁾. Também, não existe nenhum estudo genômico mostrando que raça possa ser usada como substituição a constituição gênica de um indivíduo. Portanto, não fica claro se a ancestralidade relatada pela pessoa é equivalente à ancestralidade aferida geneticamente, e isso é ainda mais difícil de ser estudado em populações miscigenadas como, por exemplo, a do Brasil⁽⁷⁰⁾.

Esta preocupação vem a propósito de um artigo publicado recentemente sobre a associação de dinitrato de isosorbida e hidralazina no tratamento de negros com insuficiência cardíaca⁽⁸⁶⁾. Na metodologia do referido artigo observa-se que o critério usado para a categorização racial foi a autodeclaração. Embora considerado como o “padrão-ouro” da classificação racial, não é possível se conferir atributos objetivos, sejam eles anatômicos, fisiológicos ou biológicos a uma definição subjetiva e sob efeito de grande variabilidade. Como é possível se comercializar um “remédio étnico-racial” baseado em critérios tão frágeis? Acreditando-se nessa hipótese, as minorias não seriam mais propensas a adoecimento como consequência de diferenças sócio-econômicas e culturais e sim devido à “herança” de genes que as predispõem a sofrer desses males em contraposição ao grupo predominante. Ou seja, bastaria “criar” medicamentos para negros e para índios que seus problemas de exclusão dos serviços de saúde de qualidade estariam resolvidos. Assim também, não seriam mais necessárias políticas de saúde objetivando equidade para os diferentes grupos raciais. Essas informações nem bem foram publicadas na literatura médica, e já estão presentes nos meios de comunicação em massa inclusive

citando o nome com o qual o medicamento irá ser comercializado: “BiDil”^(42,60). A divulgação de mensagens médicas para o público leigo atribuindo a raça um papel na causalidade de doenças foi estudado por Condit et al.⁽³²⁾ (2004), que alertaram para o risco do aumento do nível de racismo quando a mensagem usa os termos “branco” ou “negro” no seu conteúdo.

Tais afirmações não nos colocam contra o desenvolvimento da farmacogenômica, nem a favor do embargo de tais pesquisas. Porém, é preciso cuidado na publicação de artigos que atribuem benefícios de tratamento tendo como base raça, quando a definição usada não permite validação e comparação dos dados. A conclusão de que uma amostra de negros norte-americanos (definidos por ancestralidade geográfica) responda de modo peculiar a determinado medicamento quando comparado a brancos, não implica em dizer que existem diferenças genéticas entre os dois grupos. Esta “diferença racial” em relação à resposta ao medicamento deve ser entendida apenas como uma “pista” na busca do verdadeiro fator ou fatores causais. Não se pode concluir que as diferenças observadas na resposta terapêutica sejam devidas simplesmente a fatores genéticos. Primeiro porque a definição de negro nos Estados Unidos não é a mesma de outros países e segundo porque a diferença observada pode ser devido a outros fatores como hábitos de vida, nível sócio-econômico, educação e acesso a serviços de saúde, todas essas variáveis sendo muito prováveis de serem diferentes em grupos raciais distintos. E mesmo que elas fossem controladas ainda assim não seria possível atribuir aos diferentes resultados uma causa genética a menos que um ou mais genes específicos fossem identificados. Um exemplo que ilustra bem esse fato é o da elevada taxa de gestações múltiplas em indivíduos da tribo Yorubá, na Nigéria (41,6/1.000, comparada a 11/1.000 nos Estados Unidos)⁽⁴⁷⁾. Por muito tempo se acreditou que um fator genético fosse o responsável por essa diferença, até que pesquisas recentes demonstraram que isso parece se dever ao alto consumo de uma espécie de inhame com conteúdo aumentado de substância de efeito estrogênico⁽⁴⁷⁾.

Antes de comercializar um remédio étnico-racial os pesquisadores precisam deixar bem claro as seguintes

questões: (1) Como avaliar se as diferenças nos resultados são atribuídas à raça ou a outros fatores? (2) Como o médico vai saber se atributos baseados na aparência externa do paciente podem ser marcadores de complexas diferenças biológicas? (3) Como estar seguro de que uma classificação racial subjetiva baseada na autodeclaração de ancestralidade é reflexo de diferenças biológicas? (4) Como classificar as pessoas que no censo norte-americano de 2000 se declararam como membros de mais de uma raça ou que responderam que eles eram ao mesmo tempo brancos e negros?

Categorização Racial: Argumentos a Favor

Os principais argumentos utilizados para defender o uso da categorização racial em medicina são:

- 1) A sua importância é comprovada pelo aumento do número de citações na literatura médica utilizando variáveis para categorizar raça e etnia ^(1, 41). Em 1994, observou-se que cerca de 2.500 artigos científicos eram indexados a cada ano no Medline usando classificações raciais ou étnicas ⁽⁵¹⁾;
- 2) O estudo das diferenças raciais continua a ser importante para investigação de fatores não genéticos de doenças, uma vez que são amplamente reconhecidos às diferenças em relação à qualidade de vida, riscos de adquirir determinadas doenças, resposta a tratamentos e acesso a serviços de saúde entre grupos populacionais distintos como resultado da estratificação social ⁽⁴³⁾;
- 3) O uso de categorias raciais ou étnicas torna-se importante na pesquisa clínica e epidemiológica para gerar e explorar hipóteses sobre fatores de risco genéticos e ambientais que influenciam na causa, expressão e prevalência de doenças ⁽²⁴⁾;
- 4) O uso de raça e/ou etnia é importante em estudos para avaliar alocação de recursos de saúde para grupos populacionais menos favorecidos ⁽⁴³⁾;
- 5) A categorização racial auxilia o desenvolvimento da farmacogenômica ao se presumir que as frequências de variantes genéticas influenciando a eficácia de uma

droga são substancialmente diferentes entre raças. Isso poderia ajudar a prever o desenvolvimento e ajuste de doses de medicamentos a depender do perfil genético enzimático do indivíduo no que se refere ao metabolismo de drogas e tratamento de tumores; e

6) O conhecimento da ancestralidade de uma pessoa pode facilitar o teste diagnóstico para mutações específicas que sejam mais prevalentes em determinados grupos e assim facilitar seu diagnóstico e tratamento ⁽²⁴⁾ O Quadro 2, compilada através de dados de Buchard et al. ⁽²⁴⁾ (2003) mostra exemplos de doenças e de mutações frequentes em determinados grupos populacionais.

Com base nesses argumentos, os autores que defendem o uso da categorização racial em medicina acham que o seu abandono seria prejudicial aos próprios grupos que ela se propõe proteger, por dificultar a pesquisa de fatores causais de doença e de resposta terapêuticas em populações específicas ⁽²⁴⁾. A fim de minimizar as diferenças raciais na alocação de recursos, política e uso de serviços de saúde, Rathore & Krumholz ⁽⁶⁵⁾ (2004) propuseram o sistema baseado na equidade – tratamento igual baseado em necessidades iguais – desse modo permitindo o uso de categorias raciais de forma democrática.

Categorização Racial: Argumentos Contra

Vários autores têm defendido o abandono da classificação racial em medicina com base nos seguintes argumentos:

- 1) Ausência de uma definição que permita conceituar raça de forma consensual e inquestionável. O termo asiático é capaz de explicar toda a variedade encontrada em povos tais como chineses, japoneses, tailandeses, coreanos e indianos? O termo australiano é capaz de distinguir um aborígine, de um descendente de europeus nascido na Austrália? O termo africano é capaz de explicar a variedade de povos existentes naquele continente? O termo anglo ou hispânico é capaz de dar uma identidade biológica comum a todos os

Quadro 2. Variantes genéticas associadas a certas doenças e categorização racial.

Variante genética	Importância clínica	Distribuição populacional
Fator V de Leiden	Varinte fenotípica que aumenta o risco de tromboembolismo venoso profundo	5% em brancos e < 1% em asiáticos e africanos
Polimorfismo dos genes CARD15 (3 variantes específicas)	Aumento da susceptibilidade a doença de Crohn	Presente em brancos e ausentes em japoneses
Variante delta 32 do receptor CCR5	Dificulta a entrada do vírus HIV nas células protegendo contra a infecção e progressão viral	Presente em 25% de brancos europeus. No Brasil a frequência, é de 3,5% (Passos&Picanco, 1998)
Acetiladores lentos e rápidos da enzima NAT2 (N-acetiltransferase 2)	NAT2 é uma enzima envolvida na detoxificação de carcinógenos e no metabolismo de várias drogas	Acetiladores lentos: ocorrem em 14 % asiáticos, 34% afro-americanos e 54% brancos.
Variante do gene APOE ϵ 4	Aumenta o risco de doença de Alzheimer	Embora presente em frequência semelhante em todos grupos populacionais estudados, o fator de risco para variações homozigóticas é de 5 vezes para negros, 15 para brancos e 33 para japoneses.

povos de língua inglesa ou espanhola? Pessoas consideradas de cor branca no Brasil serão classificadas da mesma cor em outros países? A maioria das pessoas consegue definir com clareza um nativo das ilhas do Pacífico, um mulato claro ou um índio escuro? A resposta para todas essas perguntas é não. Desse modo, os dados da literatura não permitem a comparação dos estudos categorizados por raça uma vez que as definições são vagas demais para alcançar tal objetivo;

2) Ausência de evidência científica, tanto antropológica como genética, de que raça seja uma característica biológica: a variação genética no interior de uma população é maior do que a variação genética que distingue populações diferentes^(17, 18, 46, 48). Os traços genéticos presentes em determinados grupos são perpetuados apenas onde a endogamia é muito pronunciada (*e.g.*, judeus Ashkenazi) e, portanto não tem nada a ver com raça.

3) Ausência de associação entre as classificações raciais baseada em traços físicos e marcadores biológicos de

doença ou efeito terapêutico de medicamentos. A aparência física é determinada por um pequeno número de genes, como resultado de adaptações e seleção geográfica e que não tem como predizer genótipo a partir de sua avaliação. Não é possível associar traços físicos a um significado biológico^(4,57);

4) Raça é mais uma maneira de classificar humanos com base em conceitos sociais, políticos, étnicos, mutantes e geralmente mantidos por uma ideologia racial⁽⁵⁷⁾; e

5) Independente da classificação utilizada a miscigenação facilitada pela quebra de barreiras geográficas e culturais irá diluir cada vez mais as possíveis diferenças atribuídas a raças.

Por isto, alguns autores têm proposto a exclusão de classificação racial e/ou étnica das pesquisas médicas, alegando que além da falta de base genética para o uso destas classificações, elas servem apenas para perpetuar discriminação, preconceito, marginalização e subjugação⁽⁷⁷⁾. Para esses pesquisadores a classificação racial só teria indicação

quando para estudar o impacto do racismo ou quando para estudar da desvantagem cultural e social no acesso e uso de serviços de saúde.

Conclusão

Não existe uma forma ideal e consensual para se classificar a raça de uma pessoa. Como visto, todas as classificações raciais possuem suas limitações e arbitrariedades. A maioria dos biólogos e geneticistas nega a existência de raças biológicas na espécie humana, atribuindo a raça uma definição de construto social, ideológico e mutante. Alguns pesquisadores têm inclusive recomendado o abandono da classificação racial a não ser quando para estudar o impacto do racismo ou no estudo da desvantagem cultural e social no acesso e uso dos serviços de saúde.

Embora sem nenhuma validação científica, raça continua a ser usada para dividir grupos humanos com base em características físicas ou ancestralidade, com o argumento de que como resultado de variações na frequência de fatores genéticos e não genéticos, as taxas de doença e resposta terapêutica a medicamentos varia em diferentes populações.

Não se questiona o fato de que a estrutura dos diferentes grupos humanos seja importante para estudos epidemiológicos e de saúde pública. O que se discute é a teoria de usar raça como um marcador para características biológicas herdadas. Quando isto ocorre, por exemplo, em judeus Ashkenazi, não é porque eles constituem uma raça diferente e sim porque eles mantêm um padrão de acasalamento endogâmico o que perpetua a herança de genes deletérios nessa população e que não tem associação com a definição tradicional de raça.

O uso de termos como etnia, raça/etnia, “etnoraça” para substituir raça também não tem sentido como demonstrado anteriormente nessa revisão.

Somente com o aprofundamento dos estudos do genoma humano será possível buscar alelos e genes mutantes como causa de doença e de resposta terapêutica, ao invés de usar raça como marcador de genótipo. Até esse conhecimento genético ser disponível, o que levará muito tempo, a classificação

racial e étnica continuará a ser usada na prática clínica e nas pesquisas médicas. Algumas revistas médicas (*Nature Genetics* ⁽³⁰⁾), 2000; *Paediatric Perinatology* ⁽³⁶⁾, 2000) têm solicitado aos autores que justifiquem o uso dessas variáveis e descrevam os critérios adotados. Assim, várias propostas têm surgido no sentido de uniformizar o conceito de raça e etnia, dando-lhes um significado comum para permitir a extrapolação dos dados para as diferentes populações ^(87, 89). As mais importantes delas são:

- 1) Descrever sempre o porquê e a necessidade de usar categorização racial ou étnica em estudos científicos;
- 2) Evitar agrupar sob uma só denominação populações tão diversas como “asiáticos” ou “americanos nativos”. Por exemplo: ao invés de asiáticos, descrever “norte-americanos de origem coreana”; ao invés de americanos nativos, dizer “americanos nativos da tribo Pima”, ao invés de hispânicos, dizer “norte-americanos de origem colombiana”. Como não existe uma fórmula única ou padrão, os termos a serem usados devem ser aqueles que descrevam com maior detalhe a população estudada;
- 3) No caso de estudos feitos no Brasil, evitar agregar sob a mesma denominação pessoas pardas e negras a não ser quando isto seja importante para a homogeneidade dos dados;
- 4) Não usar cor da pele como sinônimo de ancestralidade em estudos de saúde pública tendo em vista a pobre associação entre essas duas variáveis;
- 5) Caso a hipótese de trabalho envolva um fator de risco biológico, é importante o relato de estudos prévios demonstrando algum polimorfismo já conhecido para apoiar a hipótese de trabalho;
- 6) Quando publicar relatos sobre indicadores de saúde pública relacionada à raça especificar que isso não implica que raça seja uma variável determinante de causalidade;
- 7) Acrescentar dados sobre variáveis como idade, sexo, estado sócio-econômico, estado civil, hábitos alimentares e de vida, costumes, religião, exposição ocupacional e nível de escolaridade quando eles forem importantes para tentar explicar algumas das diferenças porventura encontradas;

8) Envolver minorias raciais e étnicas na elaboração de questões sobre problemas de saúde importantes para suas comunidades;

9) Não usar raça e etnia como sinônimos;

10) Caso uma categorização racial seja utilizada, preferir a autodeclaração descrevendo em detalhes os critérios utilizados para caracterizar as populações do estudo;

11) Evitar usar classificações raciais fenotípicas a não ser quando do estudo de doenças monogênicas, estudo do racismo ou da desvantagem cultural e social em relação ao acesso e uso de serviços de saúde;

12) Como os conceitos e classificação de raça variam de um local para o outro, levar em consideração esse fato ao extrapolar dados sobre indicadores de raça e saúde publicados em outros países.

Embora não haja um consenso, o que torna as recomendações acima um pouco vagas, acreditamos que é melhor utilizá-la do que simplesmente dizer que “nossos dados mostram uma prevalência maior desta doença em brancos quando comparada com negros”. Esse tipo de relato é pouco esclarecedor e não permite ao leitor extrapolar os dados para populações miscigenadas, ou racialmente e etnicamente distintas. E mesmo que os termos raça e etnia fossem usados de forma consistente os estudos médicos ainda seriam sujeitos a crítica pela incerteza da validade de raça e etnia como variáveis de interesse.

Em conclusão, essa revisão nos permitiu chegar as seguintes observações. Não existe um conceito uniforme para raça em medicina e por isso o termo é usado de forma inconsistente tendo conotações diversas na prática clínica, no ensino e na pesquisa médica. Para algumas pessoas raça existe como algo biológico e para outras como algo construído pela sociedade para agrupar humanos em diferentes classes. A maioria dos geneticistas e antropólogos concorda acerca da inexistência de raças do ponto de vista biológico. Entretanto é fato que variações na frequência de fatores genéticos e não-genéticos afetam as taxas de doença e resposta terapêutica a medicamentos em diferentes populações. Embora não exista uma definição comum e consensual acreditamos que a categorização racial deverá continuar a ser usada em medicina até que o

reconhecimento de variações gênicas possa prever risco e orientar terapia. Para permitir um uso comum, as classificações raciais deveriam seguir as recomendações de uniformizá-las como descrito acima. O não uso de categorias raciais ou étnicas impediria o estudo de temas tão importantes como racismo, estudo de doenças monogênicas e exclusão de minorias no acesso e uso dos serviços de saúde.

Referências Bibliográficas

1. Ahdieh L, Hahn RA. Use of terms “race”, “ethnicity” and “national origins”: a review of articles in the American Journal of Public Health, 1980-1989. *Ethn Health* 1:95-8, 1996.
2. Alves-Silva J, Santos MS, Guimaraes PEM, Ferreira ACS, Bandelt H, Pena ADJ, Prado VP. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 67:444-61, 2000.
3. American Anthropological Association (AAA) statement on race. *Am Anthropol* 100:712-13, 1998.
4. Angier N. Do races differ? Not really, genes show. *New York Times*. August 22, f1, 2000.
5. Armelagos GJ. Racism and physical anthropology: Brues' review of Barkan's. The retreat of scientific racism. *Am J Phys Anthropol* 93:381-3, 1994.
6. Azevêdo ES, Silva MCOB, Tavares-Neto J. Human alcohol dehydrogenase ADH1, ADH2 and ADH3 loci in a mixed population of Bahia, Brazil. *Ann Hum Genet (London)* 39:321, 1975.
7. Azevêdo ES. Subgroups studies of black admixture within a mixed population of Bahia, Brazil. *Ann Hum Genet (London)* 44:55-60, 1980.
8. Azevêdo ES. The anthropological and cultural meaning of family names in Bahia, Brazil. *Curr Anthropol* 21:360-3, 1980.
9. Azevêdo ES. Sobrenomes no Nordeste e suas relações com a heterogeneidade étnica. *Estudos Econômicos* 13:103-16, 1983.
10. Azevêdo ES, Costa TP, Silva MCBO, Ribeiro LR. The use of surnames for interpreting gene frequency distribution and past racial admixture. *Human Biology* 55:235-42, 1983.
11. Azevêdo ES, Fortuna CMM. The reconstruction of cultural history and racial mixing from the meaning of family names in Bahia, Brazil. *Quaderni di Semantica* IV (1):209-12, 1983.
12. Azevêdo ES, Freire NBVM. Nomes e sobrenomes na interpretação da história de um povo. *Cienc Cult* 36:753-58, 1984.

13. Azevêdo ES. Raça. Conceito e Preconceito. 1ª. Edição. São Paulo: Editora Ática, 62p, ISBN 8508018789, 1987.
14. Azevêdo ES. Forças econômicas e estrutura genética de populações nordestinas. *Interciência* 12:233-8, 1987.
15. Azevêdo ES. Peculiaridades da distinção racial no Brasil. *HiperAtivo* 3:146-52, 1996.
16. Azuonye IO. Who is "black" in medical research (letter)? *BMJ* 313:760, 1996.
17. Bamshad MJ, Wooding S, Watkins WS, Ostler CT, Batzer MA, Jorde LB. Human population genetic structure and inference of group membership. *Am J Hum Genet* 72:578-89, 2003.
18. Barbujani G, Maganini A, Minch E, Cavalli-Sforza LL. An apportionment of human DNA diversity. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 94:4516-19, 1997.
19. Barros FC, Vistora CG, Horta BL. Ethnicity and infant health in Southern Brazil. A birth cohort study. *Int J Epidemiol* 30:1101-8, 2001.
20. Bean FD, Bradshaw BS. Inter-marriage between persons of Spanish and non-Spanish surname: Changes from the mid-nineteenth to the mid-twentieth century. *Soc Sci Q* 51:389-95, 1970.
21. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *New Engl J Med* 324:169-74, 1991.
22. Bina JC, Tavares-Neto J, Prata A, et al. Greater resistance to development of severe shistosomiasis in Brazilian negroes. *Hum Biol* 50:41-4, 1978.
23. Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368:455-57, 1994.
24. Burchard EG, Ziv E, Coyle N, Gomez SL, Tang H, Karter AJ, Mountain JL, Perez-Stable EJ, Sheppard D, Risch N. The importance of race and ethnic background in biomedical and clinical practice. *N Engl J Med* 348:1170-75, 2003.
25. Caldwell SH, Popenoe R. Perceptions and misperceptions of skin color. *Ann Intern Med* 122:614-17, 1995.
26. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325:31-36, 1987.
27. Carter E. Race vs Ethnicity in Dermatology. *Arch Dermatol* 139:539-40, 2003.
28. Carvalho-Silva DR, Santos FR, Pena SDJ. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* 68:281-86, 2001.
29. Cavalli-Sforza LL. Genes, povos e línguas. Editora Cia. das Letras, 304 páginas, 2003.
30. Census, race and science (Editorial). *Nat Genet* 24:97-8, 2000.
31. Chakraborty R, Barton SA, Ferrel RE, et al. Ethnicity determination by names among the Aymara of Chile and Bolivia. *Hum Biol* 61:159-77, 1989.
32. Condit CM, Parrot RL, Bates BR, Bevan JL, Achter PJ. Exploration of the impact of messages about genes and race on lay attitudes. *Clin Genet* 66:402-8, 2004.
33. Cooper RS, Rotimi CR, Ward R. The puzzle of hypertension in African-Americans. *Sci Am* 280:56-63, 1999.
34. Cooper RS, Kaufman JS, Ward R. Race and Genomics. *N Engl J Med* 348:1166-70, 2003.
35. Dressler WW. Social class, skin color, and arterial blood pressures in two societies. *Ethnicity Disease* 1:60-77, 1991.
36. For discussion: race, ethnicity and nationality (Editorial). *Paediatr Perinat Epidemiol* 14:13, 2000.
37. Giles E, Elliot O. Race identification from cranial measurements. *J Forens Sci* 7:247-57, 1962.
38. Goodman AH. Why genes don't count (for racial differences in health). *Am J Public Health* 90: 1699-1702, 2000.
39. Gould SJ. The geometer of race. *Discover* 15:65-69, 1994.
40. Harpending H, Rogers A. Genetic perspective on human origins and differentiation. *Ann Rev Genomics Hum Genet* 1:361-85, 2000.
41. Jones CP, LaVeist TA, Lillie-Blanton M. "Race" in the epidemiologic literature: an examination of the American Journal of Epidemiology, 1921-1990. *Am J Epidemiol* 134:1079-84, 1991.
42. Jornal "A Tarde": Nova droga. *Caderno de Saúde e Ciência*, p 36, 12/12/2004.
43. Kaufman JS, Cooper RS. Considerations for use of racial/ethnic classification in etiologic research. *Am J Epidemiol* 154:291-8, 2001.
44. King JC. Race: an outdated concept. *American Medical Women's Association Journal* 10:55-8, 1995.
45. Krieger H, Morton NE, Mi MP, Azevêdo E, Freire-Maia A, Yasuda N. Racial admixture in north-eastern Brazil. *Ann Hum Genet (London)* 29:113-25, 1965.
46. Lewontin RC. The apportionment of human diversity. *Evol Biol* 6:381-92, 1972.
47. Lin SS, Kelsey JL. Use of race and ethnicity in epidemiologic research: concepts, methodological issues, and suggestions for research. *Epidemiol Rev* 22:187-202, 2000.
48. Long JC, Kittles RA. Human genetic diversity and the nonexistence of biological races. *Human Biology* 75:449-71, 2003.
49. Lopes AA. Significado de raça em pesquisas médicas e epidemiológicas. In: Barata RB, Barreto ML, Almeida Filho N, Veras RP (editores). *Equidade e saúde: contribuições da epidemiologia*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz/Abrasco, p.245-56, 1997.
50. Mc Kenney NR, Bennet CE. Issues regarding data on race and ethnicity: The Census Bureau experience. *Public Health Report* 109:16-25, 1994.

51. McKenzie KJ, Crowcroft NS (Editorial). Race, ethnicity, culture and science. *BMJ* 309:286-7, 1994.
52. Ministério da Saúde. Manual de doenças mais importante, por razões étnicas, na população brasileira afro-descendente. Brasília: Ministério da Saúde; 2001.
53. Naysmith L, Waterston K, Ha T, Flanagan N, Bisset Y, Ray A, Wakamatsu K, Ito S, Rees J. Quantitative measures of the effect of the melanocortin 1 receptor on human pigmentary status. *J Invest Dermatol* 122:423-28, 2004.
54. Nicoll A, Basset K, Ulijaszek SJ. What's in a name? Accuracy of using surnames and forenames in ascribing ethnic identity in English populations. *J Epidemiol Community Health* 40:364-8, 1986.
55. Ottensooser F. Cálculo do grau de mistura racial através de grupos sanguíneos. *Rev Bras Biol* 4:531-37, 1944.
56. Parra EJ, Marcini A, Akey J, Martinson J, Batzer MA, Cooper R, Forrester T, Allison DB, Deka R, Ferrel RE, Shriver MD. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. *Am J Hum Genet* 63:1839-51, 1998.
57. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 100:177-82, 2003.
58. Passos Jr GA, Picanco VP. Frequency of the delta ccr5 deletion allele in the urban Brazilian populations. *Immunol Lett* 61:205-7, 1998.
59. Pena SDJ, Bortolini MC. Pode a genética definir quem deve se beneficiar das cotas universitárias e demais ações afirmativas? *Estudos Avançados* 18:31-50, 2004.
60. Petry A. Remédio étnico é bom? *Revista Veja*, Edição 1881, Ano 37, No. 47, p 50. Editora Abril, São Paulo – SP, Brasil, 24/11/2004.
61. Phimister EG. Medicine and the racial divide. *N Engl J Med* 348:1081-2, 2003.
62. Prata A, Schroeder S. A comparison of whites and negroes infected with *Schistosoma mansoni* in a hyperendemic area. *Gazeta Médica da Bahia* 67:93-98, 1967.
63. Praxedes RR. Cor e segregação no Brasil. *Revista Espaço Acadêmico*; Agosto, Ano III. Volume 27, 2003.
64. Primo-Parmo SL, Chautard-Freire-Maia EA, Lourenço MAC, Salzano FM, Freitas MJM. Studies on serum cholinesterase (CHE1 and CHE2) in Brazilian Indian and admixed populations. *Rev Bras Genet* 9: 467-8, 1986.
65. Rathore SS, Krumholz HM. Differences, disparities, and biases: clarifying racial variations in health care use. *Ann Intern Med* 141:635-38, 2004.
66. Rees JL. Genetics of hair and skin color. *Annu Rev Genet* 37:67-90, 2003.
67. Relethford JH. Craniometric variation among modern human populations. *Am J Phys Anthropol* 95:53-62, 1994.
68. Relethford JH. Apportionment of global human genetic diversity based on craniometrics and skin color. *Am J Phy Anthropol* 118:393-8, 2002.
69. Risch N, Burchard E, Ziv E, Tang H. Categorization of humans in biomedical research: genes, race and disease. *Genome Biol* 3:1-12, 2002.
70. Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, Feldman MW. Genetic structure of human populations. *Science* 298:2381-5, 2002.
71. Saldanha PH. Taste sensitivity to phenylthiourea among Brazilian Negroes and its bearing on the problem of White-Negro intermixture in Brazil. *Hum Biol* 29:113-25, 1962.
72. Salzano FM, Tondo CV. Hemoglobin types of Brazilian populations. *Hemoglobin* 6:85-97, 1982.
73. Sans M, Mané-Garzón F, Kolski R. Presencia de mancha mongólica en recién nacidos de Montevideo. *Arch Pediatr Uruguay* 57:149-56, 1986.
74. Sans M. Admixture studies in Latin America: from the 20th to the 21st century. *Human Biology* 72:155-77, 2000.
75. Santos SEB, Guerreiro JF, Salzano FM, Weimer TA, Hutz MH, Franco MHL. Mobility, blood genetic traits and race mixture in the Amazonian population of Oriximiná. *Rev Brasil Genet* 4:745-59, 1987.
76. Sapira JD. The art & science of bedside diagnosis. Baltimore: Urban and Schwarzenberg, 1990.
77. Schwartz RS. Racial profiling in medical research. *N Engl J Med* 344:1392-3, 2001.
78. Schwartzman S. Fora de foco: diversidades étnicas no Brasil. *Cadernos de Pesquisa* 106:83-96, 1999.
79. Seidel HM, Ball JW, Dains JE, Benedict GW. Mosby's guide to physical examination. 3rd. edition, St Louis: Mosby, 1995.
80. Senior PA, Bhopal R. Ethnicity as a variable in epidemiologic research. *BMJ* 309:327-30, 1994.
81. Stanford JL, Herrinton LJ, Schwartz SM, et al. Breast cancer incidence in Asian migrants to the United States and their descendants. *Epidemiology* 6:181-3, 1995.
82. Sturm RA, Box NF, Ramsay M. Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. *Bioessays* 20:712-21, 1998.
83. Tavares-Neto J, Azevêdo ES. Racial origin and historical aspects of family names in Bahia, Brazil. *Human Biol* 49:287-89, 1977.
84. Tavares-Neto J, Azevêdo ES. Family names and ABO blood groups in a mixed population of Bahia, Brazil. *Hum Biol* 50:361-67, 1978.
85. Tavares-Neto J. A raça branca e a forma hepatoesplênica da esquistossomose. *Rev Saúde Pública (São Paulo)* 21:342-7, 1987.
86. Taylor AL, Ziesche S, Yancy C, Carson P, D'Agostino Jr R, Ferdinand K, Taylor M, Adams K, Sabolinski M, Worcel M, Cohn JN. Combination of isosorbide dinitrate and hydralazine in blacks with heart failure. *N Engl J Med* 351:2049-57, 2004.

87. Travassos C, Williams DR. The concept and measurement of race and their relationship to public health: a review focused on Brazil and the United States. *Cad Saúde Pública* (Rio J) 20:660-78, 2004.
88. Tseng CY, Wang SL, Lai MD, et al. Formation of morphine from codeine in Chinese subjects of different CYP2D6 genotypes. *Clin Pharma Ther* 60:177-82, 1996.
89. Williams HC (Editorial). Have you ever seen an Asian/Pacific Islander? *Arch Dermatol* 138:673-4, 2002.
90. Wilson JF, Weale ME, Smith AC, Gatrix F, Fletcher B, Thomas MF, Bradman N, Goldstein DB. Population genetic structure of variable drug response. *Nat Genet* 29:265-69, 2001.
91. Witzig R. The medicalization of race: scientific legitimization of a flawed social construct. *Ann Inter Med* 125:675-9, 1996.
92. Yeracaris CA, Kim JH. Socioeconomic differentials in selected causes of death. *Am J Public Health* 68: 342-51, 1974.
93. Yu N, Chen FC, Ota S, Jorde LB, Pamilo P, Lazlo P, Ramsay M, Jenkins T, Shyue SK, Li WH. Larger genetic differences within Africans than between Africans and Eurasians. *Genetics* 161:269-74, 2002.
94. Ziegler RG, Hoove RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, Wu-Williams AH, Koloner LN, Horn-Ross PL, Rosenthal JF, et al. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natln Cancer Inst* 85:1819-27, 1993.

Resenhas Bibliográficas

Estratégia Atenção Integrada às Doenças Prevalentes da Infância AIDPI

Cristiana Maria Nascimento-Carvalho¹, Yehuda Benguigui²

Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA, Salvador, BA, Brasil¹; Unidade Saúde da Criança e do Adolescente, Área de Saúde Familiar e Comunitária, Organização Pan-Americana da Saúde, Organização Mundial de Saúde²

O livro “Estratégia Atenção Integrada às Doenças Prevalentes da Infância AIDPI” (São Paulo: S. Grisi, Y. Okay, G. Sperotto, OPAS, 500p., 2004), de Sandra Grisi, professora associada do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP), Yassuhiko Okay, professor titular do Departamento de Pediatria da FMUSP e Giuseppe Sperotto, professor titular de Pediatria da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), lançado no dia 07 de dezembro de 2004, no auditório do Instituto da Criança (USP), em São Paulo, é uma nova forma de apresentação da estratégia AIDPI.

Os grandes progressos obtidos no século XX, no que se refere à compreensão de diversas entidades mórbidas, viabilizaram a tomada de diversas ações, cujo impacto foi notável em diversas regiões do mundo. Mais notável ainda, no entanto, foi a diversidade de aplicação dos novos recursos promotores de saúde e curadores de doença, o que pode ser constatado ao se comparar a disparidade dos índices de saúde/doença nas diferentes regiões do mundo. Tamaña disparidade tem sido interpretada como reflexo da falta de equidade no acesso aos serviços de saúde e, conseqüentemente, na utilização dos novos conhecimentos e tecnologias disponíveis para a atenção à saúde. Pode-se, inclusive, inferir que a maior necessidade da humanidade, no presente momento, não é gerar novos conhecimentos, mas promover a mais ampla utilização do conhecimento atualmente já existente.

A partir da década de 80, a Organização Mundial de Saúde (OMS) promoveu, nos diferentes países do mundo, a implementação de Programas Específicos, focados em atender crianças com doenças específicas.

Tais enfoques deram limitada contribuição à promoção da saúde da criança, da família e da comunidade, tendo sido considerados como oportunidades perdidas para a prevenção e detecção de outros problemas.

A estratégia AIDPI (Atenção Integrada às Doenças Prevalentes da Infância), elaborada pela OMS e pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), surgiu como tentativa de vincular as diferentes estratégias pré-existent, incluindo aspectos de prevenção aos aspectos de diagnóstico e tratamento, caracterizando-se como estratégia curativa e preventiva durante o mesmo atendimento. Essa estratégia, lançada em 1996, foi adotada pela maioria dos países. Diversos estudos de intervenção na comunidade apresentaram forte evidência do substancial impacto dessa estratégia, por exemplo, em mortalidade por pneumonia⁽¹⁾.

Para a adequada implementação da AIDPI, é necessário que todos os profissionais atuantes no cuidado das crianças conheçam e saibam utilizar essa estratégia.

Durante o ano 2000, a Organização Panamericana de Saúde (OPAS, Escritório Regional para as Américas da OMS) e a Associação Latino-Americana de Pediatria (ALAPE) realizaram um interessante estudo que incluiu cerca de 300 Departamentos de Pediatria de Faculdades de Medicina da América Latina. Nesse estudo, foi possível demonstrar que o treinamento dos estudantes de Medicina ocorre majoritariamente em hospitais universitários, enquanto que a atuação dos médicos recém-formados concentra-se, principalmente, em unidades de atenção primária.

Ademais, até antes do lançamento do livro, motivo desta resenha, todo o material instrutivo da AIDPI

caracterizava-se como manual prático de orientação específica para a utilização da técnica, sem qualquer abordagem dos fundamentos.

O livro de autoria de S. Grisi, Y. Okay e G. Sperotto foi uma iniciativa pioneira de apresentação da AIDPI no conjunto de aspectos fisiopatológicos e clínicos que substanciam a estratégia de modo a permitir que professores e estudantes de Medicina possam tê-lo como fonte de conhecimento e consulta para a aprendizagem do conteúdo apresentado em cujo contexto está a AIDPI.

Em última instância, a expectativa é que o livro seja uma ferramenta prática para a promoção da atenção integrada à saúde dos pacientes pediátricos com conseqüente impacto nos indicadores de saúde/doença das crianças.

Referência Bibliográfica

1. Rasmussen Z, Pio A, Enarson P. Case management of childhood pneumonia in developing countries: Recent relevant research and current initiatives. *Int J Tuberc Lung Dis* 4: 807-826, 2000.

VITAMINAS: Verdades e Mitos

Luiz Erlon Araújo Rodrigues (Salvador: 2004. 252p. Inclui bibliografia. ISBN 85-904593-1-4)

Moysés Sadigursky

Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA, Salvador, BA, Brasil

Este é um livro que é destinado e deve ser lido por todos os profissionais da área de saúde, incluindo médicos, nutricionistas, farmacêuticos, enfermeiros, biólogos, estudantes, além do público em geral que se interessa pelas vitaminas, mas têm uma visão distorcida das mesmas.

O livro, dividido em 14 capítulos, é apresentado de forma muito didática, com uma linguagem científica, mas bastante acessível. Os capítulos de 1 a 4 são dedicados às vitaminas lipossolúveis, ou sejam:

vitaminas A (carotenos e carotenóides), vitaminas D, vitaminas E e vitaminas K. Os capítulos de 5 a 14 são dedicados às vitaminas hidrossolúveis: vitaminas B1, vitaminas B2 (riboflavina ou beflavina), vitaminas B3 (niacina ou biacinamida ou PP), vitaminas B5 (ácido pantotênico e panteteína), vitaminas B6 (piridoxal, piridoxamina ou vitamina G), vitaminas B12 (cobalaminas), vitaminas H (biotina ou B8), substâncias folicas (ácido fólico ou vitamina Bc), vitamina C (ácido

ascórbico) e vitaminas P (flavonóides e heterosídeos flavônicos).

A maneira como são estruturados os capítulos faz a leitura ser agradável e elucidativa. A depender do interesse momentâneo do leitor, pode-se tomar conhecimento da história da descoberta de cada uma das vitaminas, a nomenclatura e classificação, a ocorrência na natureza, o metabolismo, as necessidades diárias, as propriedades nutricionais e fisiológicas, as vitaminas como agentes terapêuticos e os efeitos das hipervitaminoses. Cada capítulo é encerrado com uma lista das principais crendices relacionadas a cada vitamina. A leitura isolada de cada item específico, de cada capítulo acima relacionado, não prejudica o entendimento, mas provoca no leitor o desejo de saber mais.

Já na introdução do livro o autor conclama para o bom senso de que as vitaminas, que são compostos essenciais para o funcionamento normal do metabolismo celular, não devem ser usadas em excesso. Alerta de que o uso das vitaminas como drogas terapêuticas, remédios para curar doenças, diferentes daquelas carenciais, não parece ser uma boa conduta. Cita exemplo de um tratamento inadequado com 50 gramas de vitamina C que corresponde ao conteúdo de vitamina C em 1.000 laranjas. Vários outros absurdos terapêuticos com outras vitaminas são também citados.

A bibliografia é rica e pertinente com 145 referências para quem quiser obter mais dados sobre as vitaminas.

Sobre o autor:

O professor, doutor, Luiz Erlon Araújo Rodrigues é graduado em Medicina pela Faculdade de Medicina da Bahia – UFBA. Doutor em Bioquímica Médica pela Universidade de Paris. Pós-doutor em Enzimologia e Microanálises nas Universidades de Los Angeles-California (EUA), de Paris X (Nanterre) e de Paris XII (Créteil), França. É professor titular da Faculdade de Medicina da Bahia-UFBA e da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública da FBPDC, atuando em cursos de graduação e cursos de pós-graduação, ensinando e orientando dissertações de mestrado e

teses de doutorado. É brilhante pesquisador com mais de 150 trabalhos científicos publicados em periódicos nacionais e internacionais. É membro das Academias de Medicina da Bahia e de Ciências de Nova York (EUA).

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

1. Informações Gerais

A Gazeta Médica da Bahia (GMBahia), fundada em 10 de julho de 1866, teve circulação regular de 1866 a 1934 e de 1966 a 1972, e outro número avulso em 1976. A GMBahia é órgão oficial da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia e tem periodicidade semestral, mas a partir de 2006 será trimestral.

Os trabalhos submetidos à Gazeta Médica da Bahia serão encaminhados aos membros do Conselho Editorial, que decidirão sobre sua aceitação (com ou sem revisão) ou recusa, sem conhecimento de sua autoria (“blind review”).

A revista tem como linha editorial publicações científicas e trabalhos técnicos e de extensão vinculados, estritamente, à área médica em temas de interesse da saúde coletiva, epidemiologia, clínica, terapêutica, diagnóstico ou da reabilitação, ou de áreas correlatas.

Aceitam-se trabalhos escritos em português, espanhol ou inglês, com título, resumo e palavras-chaves no idioma original e em inglês. Serão aceitos exclusivamente em língua portuguesa se for editorial, resenha bibliográfica, noticiário ou carta ao Editor. As demais formas de publicação devem conter resumo e “abstract”: artigo original; artigo de revisão (esse só será aceito de autor convidado pelo Conselho Editorial); artigo de opinião (“Ponto de vista”); discussão de caso na área da Bioética ou Ética Médica; conferência; comunicação (“Nota prévia”); relato de caso; informe técnico; resumo e “abstract” de Monografia; Dissertação ou Tese; relatório de atividade de extensão; opinião de estudante de Medicina; nota sobre História da Medicina; e projetos e atividades na área da Educação Médica. Outro tipo de abordagem deverá, previamente à apresentação, receber autorização do Conselho Editorial da GMBahia.

A publicação submetida em língua inglesa ou espanhola deve vir acompanhada de resumo em língua portuguesa.

2 Considerações Éticas e Bioéticas

Todos os trabalhos submetidos, envolvendo a participação de seres humanos, devem observar as recomendações da Declaração de Helsinki de 1975 (revisada em 1983) e aquelas da Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. No trabalho deve ser citado qual o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) aprovou o projeto de pesquisa que originou a publicação, informando também o número/ano do Parecer (*e.g.*, ... aprovado pelo Parecer nº 24/2004 (ou assinale a data, se não houver número), do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário ... [cidade, Estado] ...”.

3. Formato Geral do Trabalho a Ser Submetido

3.1 todo o trabalho deve ser compatível com o processador de texto “WORD for WINDOWS”®, em qualquer das versões do “software” e desde que assinala na etiqueta do CD (*vide* item 3.18);

3.2 ao digitar o texto, o comando de retorno da linha “enter” só deve ser utilizado no final de cada parágrafo; em nenhuma hipótese será aceito trabalho que ao final de cada linha conste um “enter”, pois só é cabível ao final do parágrafo;

3.3 também não utilizar “tab” para recuo da primeira linha ou centralização de título ou capítulo;

3.4 não utilizar espaço (“enter”) adicional entre os parágrafos;

3.5 margens esquerda e direita com 3,0cm, e a superior e inferior de 2,5cm;

- 3.6 as margens direita e esquerda devem ser alinhadas (justificadas);
- 3.7 todas as páginas devem ser numeradas, inclusive a primeira, com números arábicos e no canto superior direito;
- 3.8 o espaçamento de todo o texto deve ser duplo (exceto no título e “corpo” das tabelas, gráficos, figuras, etc.);
- 3.9 o tamanho da fonte (letra), de todo o texto, deve ser 12, inclusive o título do trabalho;
- 3.10 todos os trabalhos devem ter título em língua portuguesa e inglesa (exceto se for editorial, resenha bibliográfica, noticiário ou carta ao Editor), sendo o primeiro na mesma língua empregada no texto. O primeiro título deve ficar em negrito e com fonte no formato “times new roman” e, o segundo, sem negrito e com fontes em “arial” e em itálico.

Exemplos (extraídos da RSBMT 34 (2), 2001):

Facial nerve palsy associated with leptospirosis

Paralisia facial associada à leptospirose

ou

Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil

Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil

3.11 todo o texto deve ser redigido no formato de fonte “times new roman”, exceto o segundo título (*vide* acima) ou quando houver outra indicação técnica;

3.12 não citar abreviaturas (sem antes a expressão completa) ou referência bibliográfica no resumo ou no “abstract”;

3.13 no texto (exceto do resumo ou no “abstract”) as referências devem ser citadas da seguinte forma:

- se o(s) autor(es) é (são) sujeito(s) do período ou da sentença. Exemplo:
... Carmo et al.⁽⁵⁾ (no caso de três ou mais autores, sendo o ⁽⁵⁾ sobrescrito correspondente ao número da referência bibliográfica) e Bittencourt & Moreira⁽³⁾ (no caso de dois autores, com o “&” comercial entre os mesmos, sendo o ⁽³⁾ sobrescrito também correspondente ao número da referência bibliográfica) reviram, recentemente, a literatura e assinalaram ...

- a(s) referência(s) bibliográfica(s) é(são) citada(s) conforme o número da referência bibliográfica. Exemplo:

... Em revisões recentes^(3,5), foi assinalado a dispersão de pessoas com história da infecção, não obstante outros autores ^(2,4,11-16,25) avaliam isso como efeito da migração de pessoas ... (no caso, todos trabalhos foram citados pelo número da referência bibliográfica correspondente)

3.14 quando o formato do trabalho couber capítulo (*e.g.*, artigo, conferência) não “quebrar a página” entre um capítulo e o seguinte. O texto deve ser contínuo;

3.15 figuras, gráficos, quadros, tabelas, etc., cada um destes elementos deve ficar em arquivo (CD) à parte e encaminhado, nas cópias impressas, na ordem de citação e após o capítulo referências bibliográficas. A GMBahia não aceita para publicação elementos coloridos (figuras, gráficos, etc.), mas, se houver indicação técnica, o autor deverá ressarcir as despesas adicionais com fotolitos e impressão;

3.16 figuras, gráficos, quadros, tabelas, etc., só serão aceitos se digitados ou reproduzidos nos seguintes formatos: BMP, TIFF, PICT, GIF, ou outro de fácil compatibilidade;

3.17 além das cópias impressas o autor responsável pela correspondência deve anexar CD, obrigatoriamente, com etiqueta especificando o conteúdo e o sobrenome do primeiro autor em destaque;

3.18 na etiqueta do CD, os arquivos devem ser nomeados da seguinte forma:

- ✓ arquivo com o texto: sobrenome do primeiro autor[tabela1]
- ✓ anexo(s):
 - sobrenome do primeiro autor[tabela1]
 - sobrenome do primeiro autor[tabela2]
 - sobrenome do primeiro autor[quadro1]

3.19 antes de encaminhar as 4 (quatro) cópias impressas, exclua do CD todos os arquivos não relacionados ao trabalho encaminhado;

3.20 em todo o conteúdo, se for em língua portuguesa, os números decimais devem ser separados por vírgula (13,3%) e os milhares por ponto (1.000.504 pessoas), mas, se for em língua inglesa a mesma situação é inversa, respectivamente: 13.3% ou 1,000,504.

4. Itens de Cada Tipo de Trabalho

4.1 primeira página: títulos (em língua portuguesa e inglesa, ou vice-versa); nomes dos autores (com número sobrescrito para a correspondência institucional na nota de rodapé), resumo (na linha seguinte: palavras-chaves) e “abstract” (na linha seguinte “key-words”). O número de palavras-chaves (ou de “key-words”) deve ser no mínimo de três (3) e no máximo seis (6). Ainda na primeira página, citar um “short title” com até 40 toques (incluindo os espaços entre as palavras), em língua portuguesa ou, caso se aplique, espanhol e em inglês. Primeiro o resumo, se o texto for em língua portuguesa, ou abstract, se na língua inglesa. Os nomes dos autores devem ser registrados, preferencialmente: prenome e último sobrenome, abreviando ou excluindo os nomes intermediários, exceto Filho, Neto, Sobrinho, etc. (e.g., Demétrio C. V. Tourinho Filho ou Demétrio Tourinho Filho);

4.2 nota de rodapé da primeira página:

1ª linha: vinculação institucional principal do(s) autor(es), antecedida pelo número de registro, citado sobrescrito após o nome de cada autor; cidade, abreviatura do Estado [e.g., 1. Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA, Salvador, BA; 2. Hospital Geral do Estado (SESAB), Salvador, BA]. Não citar titulação, ocupação, cargo ou função;

linha seguinte: Fonte (ou fontes) de financiamento, se houver;

linha seguinte: **Endereço para correspondência** (em negrito e itálico): nome do autor responsável pela correspondência, endereço, CEP cidade, País. Telefone e/ou FAX. Exemplo: Dra. Magda Villanova, R. das Ciências 890 (Apto. 12), 40845-900 Salvador, BA, Brasil. Tel.: 55 71 789-0906; FAX: 55 71 789-6564;

linha seguinte: endereço eletrônico (campo obrigatório, e com fontes de cor preta);

linha seguinte: registrar a expressão: “Recebido para publicação em” (a data será registrada pela Secretaria da Revista);

4.3 o resumo e o “abstract” (correspondendo à tradução do primeiro), na primeira página, devem ter até 250 palavras, ou até 100 palavras se for comunicação, informe técnico ou outros formatos. O formato do resumo deve ser o narrativo, destacando objetivo(s), material(is) e método(s), local e população de estudo, principais resultados e conclusões (considerando os objetivos do trabalho). O resumo e “abstract” não devem conter citações bibliográficas ou abreviaturas (exceto se citar previamente) o nome ou expressão por extenso;

4.4 os artigos e as comunicações devem ter, respectivamente, até 20 (vinte) e dez (10) páginas impressas, incluindo as páginas correspondentes às figuras, tabelas, etc.;

4.5 os artigos têm os seguintes elementos:

4.5.1 primeira página, *vide* acima;

4.5.2 as páginas seguintes (no máximo três), correspondendo ao capítulo introdução (a palavra “introdução” não deve ser registrada), devem conter a delimitação da pergunta a ser estudada e as justificativas de forma objetiva;

4.5.3 capítulo subsequente, **MATERIAL E MÉTODOS**, escritos de forma que o leitor tenha a exata compreensão de toda a metodologia e população estudada. Quando se aplicar (*vide* item 2), citar Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) e número do Parecer que aprovou o projeto de pesquisa de onde se originou o artigo. As técnicas e métodos, já estabelecidos na literatura, devem ser descritos pela citação bibliográfica afim. Apenas se for estritamente necessário, este capítulo pode conter figura ou mapa, gráfico, quadro, tabela, etc. Caso se aplique, de forma objetiva, deve ser citado o plano da análise estatística;

4.5.4 capítulo subsequente, **RESULTADOS**, escritos de forma clara e objetiva, sem interpretação de nenhum deles. O número de Tabelas, Figuras, Quadros, etc., deve ser o mais restrito possível e citados no texto pelo número arábico correspondente, da seguinte forma: “... na **Tabela 2** as principais as alterações eletrocardiográficas foram associadas ao tipo de saída hospitalar do paciente ...” ou “As principais alterações eletrocardiográficas foram associadas ao tipo de saída hospitalar do paciente (**Tabela 2**) ...”;

4.5.5 capítulo subsequente, **DISCUSSÃO**, baseada na interpretação dos resultados observados (sem repeti-los em detalhes e sem a citação de tabelas, figuras, etc.), comparando-os com a bibliografia pertinente. As especulações, sugestões ou hipóteses devem ter como fundamentação os resultados observados;

4.5.6 capítulo, se couber, de **AGRADECIMENTOS** - citando, sumariamente, o nome completo da pessoa (instituição) e qual a real contribuição ao trabalho;

4.5.7. capítulo final, das **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** (as mesmas normas são aplicadas aos demais formatos de trabalhos). Não usar outros termos aparentemente equivalentes (Bibliografia, Referências, etc.). Devem ser ordenadas em rigorosa ordem alfabética, numeradas consecutivamente, e citando todos os co-autores – exceto se houver 25 ou mais co-autores, nesse caso cite os 24 primeiros seguidos da expressão latina *et al.* No texto (exceto se sujeito da sentença), tabelas e em legendas de ilustrações, as referências bibliográficas devem ser citadas por numerais arábicos e entre parênteses ⁽¹⁾ ou ^(2 14 23). Só a letra primeira letra do sobrenome de cada autor deve ficar em maiúscula e as demais abreviaturas não devem ser seguidas por ponto ou ponto e vírgula entre os autores. Se houver mais de um trabalho do(s) mesmo(s) autor(es), a ordem dever ser cronológica, começando pelo mais antigo;

4.6 ainda sobre as Referências bibliográficas, use o estilo dos exemplos adiante descritos e que observam os formatos usados pela “National Library of Medicine” (NLM) no *Index Medicus*. Os títulos das revistas ou periódicos devem ser abreviados de acordo com a formatação oficial estabelecida no *Index Medicus*. Em caso de dúvida, consulte a Lista de Revistas Indexadas no *Index Medicus* (“List of Journals Indexed in *Index Medicus*”), publicada anualmente pela NLM em separado e também no número de janeiro de cada ano do *Index Medicus*, a qual pode ser obtida no endereço eletrônico <http://www.nlm.nih.gov> (ou mais especificamente no: http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html; depois “clique” sobre o formato de impressão desejado [“available formats”]);

4.6.1 o estilo dos requisitos uniformes (o estilo de Vancouver) baseia-se, amplamente, no estilo-padrão ANSI adaptado pela NLM para seus bancos de dados (*e.g.*, MEDLINE).

Nas modalidades de referências, nota foi incluída quando o estilo Vancouver difere do atualmente usado pela NLM;

4.6.2 modalidades de trabalhos a serem citados (alguns exemplos são fictícios):

Artigo

Almeida BS, Tavanni GHT, Silva YHU, Caldas HFT, Almeida Neto BS. Níveis de aminotransferases em escolares de Mendonça (SE), soronegativos para os vírus das hepatites B e C. Rev Soc Bras Med Trop 56: 34-39, 2001. Não citar número da revista ou periódico, só o volume.

Tese, Dissertação, Monografia ou assemelhando

Britto Netto AF. Distribuição espacial dos casos de sarampo no Nordeste brasileiro, de 1960 a 2002 [tese de Livre-Docência]. Salvador: Universidade Federal da Bahia, 2003.

Livro

Carmo HF, Fonseca Filho TG, Melo-Silva TT. Antropologia médica: estudos afro-brasileiros. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 302p., 2001.

Capítulo de livro:

Vinhais C. Conduta e tratamento: hipertensão arterial. In: Sardinha GTR, Romero MC (ed), Terapêutica clínica. 1ª edição. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 123-129, 2001.

Resumo de trabalho científico apresentado em Evento Científico

Araújo JS, Carneiro JN, Almeida BS, Tavanni GHT, Silva YHU, Caldas HFT, Almeida Neto BS. Esquistossomose mansônica na cidade do Salvador, Bahia. In: Resumos do XXII Simpósio Internacional de Medicina Tropical, 20 a 27 de setembro, Rio Branco, p. 87, 1999.

Patente

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. Jun 25, 1995.

Publicação extraído de período ou jornal popular

Marconi TQ. Novo caso de raiva humana em Salvador. Jornal Clarin, Salvador, junho 21; Sect. A:3 (col. 5), 1999.

Publicação audiovisual [videocassete] [DVD], [CD-ROM] etc.

HIV+/AIDS: the facts and the future [videocassete]. St. Louis: Mosby-Year Book, 1995.

Mapa (não parte de alguma publicação específica)

Estado da Bahia. Distribuição dos casos de calazar [mapa demográfico]. Salvador: Secretaria de Estado de Saúde, Departamento de Epidemiologia, 2001.

4.6.3.8 publicação sem número ou volume: ... Curr Opin Gen Surg 325-33, 1993.

4.6.3.9 paginação em numerais romanos: ... Hematol Oncol Clin North Am 9: xi-xii, 1995.

4.6.3.10 se carta (letter) ou resumo (abstract) em publicação periódica: Clement J, Fischer PA. Metronome in Parkinson's disease [letter]. Lancet 347: 1337, 1996. Ou seja, colocar entre colchetes letter ou abstract.

4.6.3.11 publicação de erratum: Hamlin JA, Kahn AM. Herniography in symptomatic patients following inguinal hernia repair [published erratum appears in West J Med 162: 278, 1995]. West J Med 162: 28-31, 1995.

4.6.3.12 publicação contendo retratação: Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. Ceruloplasmin gene ... [retraction of Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. In: Nat Genet 6: 426-31, 1994]. Nat Genet 11: 104, 1995.

4.6.3.13 publicação retratada: Liou GI, ..., Matragoon S. Precocious IRBP gene ... [retracted in Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 3127, 1994]. Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 1083-8, 1994.

4.7 não incluir entre as referências bibliográficas: trabalhos submetidos e ainda não-aprovados; dados não-publicados ou comunicação pessoal. Essas informações devem citadas no texto, do seguinte modo: "... foi observado em 44,5% dos casos a mesma lesão [Almeida Neto & Souza R em 20/11/2004: dados não-publicados]" ou em caso de comunicação pessoal: "... o ajuste do aparelho X[®] (nome do fabricante, cidade) para a temperatura ambiente de 25°C, foi realizado do seguinte modo ... [Silva-Araújo J (FAMEB/UFBA), comunicação pessoal em 07/10/2003]";

4.8 os quadros (fechados com linhas verticais nas laterais), figuras, gráficos e ou tabelas (sem linhas verticais) devem ter título objetivo, numeração com algarismo arábico e título [e.g. **Tabela 4**. Indicadores demográficos da população de Cavunge, Ipecaetá, Bahia (2001)]. A compreensão desses elementos deve independer da leitura do texto. Em caso de figura, deve ser numerada no verso e o título encaminhado em folha à parte. Caso a(s) figura(s) ou outro(s) elementos seja(m) colorido(s), o autor principal deve informar ao Editor da GMBahia a fonte de custeio dessa despesa;

5. Submissão do Trabalho

Na carta ao Editor da GMBahia deve constar a assinatura de todos os autores do trabalho, mas, se isso não for possível anexar à correspondência cópia de FAX ou de mensagem eletrônica autorizando o(a) autor(a) responsável a apresentar o trabalho para publicação. Na correspondência devem constar as seguintes informações: título do trabalho; seção da GMBahia ou tipo de trabalho (se artigo, conferência, comunicação, ou outro tipo de apresentação); declaração que o trabalho está sendo submetido apenas à GMBahia; e a concordância de cessão dos direitos autorais para a GMBahia.

Caso haja a utilização de figura, tabela, etc. publicada em outra fonte, deve-se anexar documento que ateste a permissão para seu uso em publicação científica. Nesse caso, o documento probatório deve constar nome, endereço, e-mail, telefone e fax do autor responsável ou do Editor da publicação original.

Antes de submeter o trabalho, uma a uma das exigências deve ser revista pelo autor responsável para evitar a devolução ou a rejeição do trabalho pela Secretaria da GMBahia.

Caso o trabalho seja entregue pessoalmente por um dos autores na Secretaria da GMBahia, o autor responsável deve trazer uma segunda via da carta de submissão para o devido registro de recebimento pela Secretaria. Não será aceito nenhum trabalho entregue por terceiros ou em locais não autorizados. O trabalho deve ser encaminhado, preferencialmente, através de correspondência registrada para o seguinte endereço:

Gazeta Médica da Bahia

Faculdade de Medicina da Bahia (UFBA)
Largo do Terreiro de Jesus, Centro Histórico de Salvador
40025-010 Salvador, Bahia, Brasil