



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações  
 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
 Coordenação de Capacitação  
 Divisão Apoio Técnico

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO INPA  
 RELATÓRIO FINAL

**AVALIAÇÃO DE DIAMIDÍNICOS ANÁLOGOS DO ISETIONATO DE  
 PENTAMIDINA CONTRA FORMAS AMASTIGOTAS DA *Leishmania*  
*(Leishmania) amazonensis* E *Leishmania (Viannia) guyanensis***

**BOLSISTA:** Maianne Yasmin Oliveira Dias

**ORIENTADOR(A):** Antônia Maria Ramos Franco Pereira

Relatório Final apresentado ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como requisito para a conclusão como participante do Programa de Iniciação Científica do INPA.

Manaus – Amazonas  
 2017

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
 CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
 INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





## Avaliação de diamidínicos análogos do Isetionato de Pentamidina contra formas amastigotas da *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*

### Resumo

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, negligenciada, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas a partir do repasto sanguíneo de seus vetores. A interação parasito-hospedeiro inicia no intestino dos insetos vetores, onde as formas promastigotas deixam de se reproduzir e tornam-se infectantes. Após a inoculação no hospedeiro vertebrado, as promastigotas passam para o meio intracelular por fagocitose e se transformam na forma amastigota. O controle da LTA é concentrado no tratamento da infecção. A droga de primeira escolha para o tratamento é o Antimonial pentavalente, e de segunda escolha são a Anfotericina B e a Pentamidina. Em face ao desconforto, a deformidade, o tempo prolongado de tratamento e a variedade de efeitos adversos das drogas atuais, o presente estudo avalia o potencial leishmanicida de análogos da Pentamidina contra formas amastigotas das espécies *Leishmania guyanensis* e *Leishmania amazonensis*. Foram testados dois análogos fluorados da Pentamidina, identificados por 52AF e 56AF. Os parasitos foram obtidos a partir da coleção de células mantida no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas (COSAS-INPA), e os macrófagos a partir de camundongos BALB/c machos, saudáveis, fornecidos pelo Biotério Central do INPA. A avaliação citotóxica foi realizada em placa de 96 poços, com as substâncias testadas em três concentrações, e, posteriormente, incubadas a 24 e 48 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Nos bioensaios utilizaram-se placas de 24 poços com lamínula, os análogos foram testados em 3 concentrações contra as amastigotas. Em seguida, as lamínulas foram coradas para análise da eficiência sob microscopia óptica. A Pentamidina, assim como seus análogos, se mostraram tóxicos nas maiores concentrações propostas, após exposição de macrófagos murinos a 24 e 48 horas. Quando a exposição é prolongada até 48 horas há um indicativo de menor toxicidade do 56AF em relação ao outro análogo. As substâncias testadas mostraram efeito sobre os amastigotas das duas espécies de *Leishmania* testados, mas com

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
Coordenação de Capacitação  
Divisão Apoio Técnico

---

redução na taxa de infecção maior quando os macrófagos eram parasitados por *L. guyanensis*, sugerindo um efeito maior sobre essa espécie. As substâncias não se mostraram melhores do que o controle positivo nos testes propostos, mas mantiveram atividade similar.

**Palavras Chave:** Amastigota, Citotoxicidade, Leishmania, Tratamento.

**Subárea:** Saúde

**Financiamento:** PIBIC/CNPq

Data: 20/10/2017

Maianne Dias

Bolsista

Marcélia de Oliveira Farias Louff  
p/Orientador(a)

Marcélia de Oliveira Farias Louff, MSc  
Pesq. Titular III  
INPA / MCT

---

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





## INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas a partir do repasto sanguíneo de seus vetores, insetos alados denominados de flebotomíneos, pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae (Basano e Camargo, 2014; SVS, 2009). A LTA provoca lesões na pele, principalmente úlceras em partes expostas do corpo, de formato arredondado ou ovalado, variando de tamanho, com base eritematosa, infiltrada e de consistência firme, possuindo bordas bem delimitadas e elevadas, com fundo avermelhado e granulações (SVS, 2009; WHO, 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2016), são registrados, aproximadamente, 1,5 milhão de novos casos de leishmaniose por ano, distribuídos em 98 países, dos quais apenas 30 realizam a notificação compulsória dessa parasitose. A maior parte dos casos, cerca de 90%, ocorre em apenas seis países: Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Brasil e Peru (WHO, 2016). A ocorrência da LTA na América do Sul é reportada em todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile (Gontijo e Carvalho, 2003), sendo o Brasil o país que concentra o maior número de casos. Em 2014 foram registrados 20.296 casos no Brasil, dos quais 10.387 ocorreram na região norte, com o Amazonas registrando 1.801 destes. No mundo são notificados 1,5 milhão de novos casos anualmente (SVS, 2014; WHO, 2016).

Nas Américas, são reconhecidas 11 espécies de *Leishmania* causadoras da LTA, se destacando no Brasil sete delas, seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As mais comuns identificadas provocando a LTA são a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (distribuída pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia legal); a *Leishmania (Viannia) guyanensis* (aparentemente limitada à Região Norte, estendendo-se pelas Guianas); e a *Leishmania (Viannia) braziliensis* (foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita e incriminada como agente etiológico da LTA; é a mais importante, não só no Brasil, mas em toda a América Latina) [Gontijo e Carvalho, 2003; SVS, 2014].

O ciclo biológico da *Leishmania* tem como ponto central a interação parasito-hospedeiro, a qual inicia no intestino dos insetos vetores, flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* ou *Phlebotomus*

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





(SVS, 2009). As formas promastigotas passam por um processo no qual estas formas deixam de se reproduzir e tornam-se infectantes, em seguida migram para a faringe e cavidade bucal, de onde elas são transmitidas ao hospedeiro vertebrado, durante o próximo repasto sanguíneo dos flebótomos (SVS, 2010). Após a inoculação, as promastigotas passam para o meio intracelular por meio de fagocitose mediada por receptores de células, se transformando em amastigota no interior de células do sistema fagocítico mononuclear, forma característica do parasitismo nos mamíferos. Embora os macrófagos, principal monócito envolvido no processo descrito, sejam células fagocitárias especializadas no combate a agentes infecciosos, as leishmânias desenvolveram mecanismos de defesa capazes de subverter sua capacidade microbicida, conseguindo sobreviver neste ambiente potencialmente tóxico e multiplicar-se até a ruptura da célula, quando são liberadas para infectar outros macrófagos, propagando a infecção (Gontijo e Carvalho, 2003; MANUAL DE VIGILANCIA, 2010).

O controle da LTA é concentrado basicamente no tratamento da infecção, uma vez que alternativas, como controle vetorial ou mesmo a imunização não são eficientes (Lima *et al*, 2007). A droga de primeira escolha para o tratamento é o Antimonial pentavalente, o qual é administrado por via endovenosa ou intramuscular durante 20 dias consecutivos, sendo recomendado dose diária que varia entre 10 a 20 mg de  $Sb^{+5}/Kg$ . As drogas de segunda escolha são a Anfotericina B e a Pentamidina, administrados em casos de resistência ao tratamento convencional (MANUAL DE VIGILÂNCIA, 2010). Os fármacos administrados atualmente causam efeitos colaterais, como vômito, febre, tontura, inchaço e dor no local da aplicação, anemia, glicemia alterada, além de insuficiência renal e toxicidade elevada (Gontijo e Carvalho, 2003; Lima *et al*, 2007). Estudos para novas drogas buscam resultados clínicos satisfatórios e já observaram significativa redução nos efeitos adversos (Almeida e Santos, 2011; Pinheiro, 2003), principal causa no abandono dos tratamentos.

Em face ao desconforto e a deformidade que essa patologia pode provocar nos enfermos, o tempo prolongado de tratamento e a variedade de efeitos adversos das drogas atuais, faz-se necessário o estudo de novas drogas menos tóxicas, mais eficazes contra diferentes espécies e que possam minimizar o abandono do tratamento, e abordagens utilizando drogas já conhecidas adaptadas quimicamente mostram potencial para esse objetivo. O Presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial leishmanicida de dois análogos da Pentamidina contra formas amastigotas das espécies *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* em macrófagos peritoneais murinos.

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





## MATERIAL E MÉTODOS

**Substâncias testadas:** Foram testados dois análogos fluorados da Pentamidina, identificados por 52AF e 56AF, produzidos por parceiros do Instituto de Química Orgânica da Academia Nacional de Ciências da Ucrânia e Departamento de Química Inorgânica da Universidade de Helsinki. As substâncias, métodos e resultados obtidos a partir do estudo dessas substâncias estão vinculados a projeto de doutorado desenvolvido no grupo de pesquisa. Os processos de obtenção dos produtos finais testados, assim como fórmulas e dados físico-químicos dos diamidínicos estão sendo mantidas sob sigilo para não comprometer outros trabalhos em desenvolvimento assim como publicações futuras.

**Cultivo de *Leishmania*:** Foram utilizados parasitos das espécies *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/2009/IM5584), ambos obtidos a partir da coleção de células mantida no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas (COSAS-INPA). Os protozoários, em forma promastigotas, foram transferidos para tubos contendo meio bifásico NNN (McNeal e Novy, 1904; Nicolle, 1908) e, após uma semana, foram transferidos para garrafas de cultivo celular contendo meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), filtrado em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro (*Millipore*) e suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) e 50  $\mu\text{g/mL}$  de gentamicina. Os parasitos que foram utilizados na infecção dos macrófagos, etapa descrita a seguir, foram obtidos a partir desse cultivo, quando os promastigotas atingiram a fase estacionária.

**Macrófagos peritoneais murinos:** Foram utilizados camundongos BALB/c machos, saudáveis e com idade média de 8 semanas, fornecidos pelo Biotério Central do INPA (Nº do Parecer da CEUA:008/2015), para a obtenção dos macrófagos utilizados nesse estudo. Após anestésiar e eutanasiar os animais, injetou-se intraperitonealmente de 2 - 4 mL de RPMI incompleto, seguido de uma massagem local e posterior retirada do conteúdo injetado. Todo o volume obtido foi centrifugado (4.400 rpm/10 min) e as células precipitadas eram ressuspensas em RPMI completo (acrescido de 10% SFBi). Os macrófagos obtidos foram quantificados em hemocítmetro e utilizados na preparação de suspensão celular contendo 10<sup>5</sup> macrófagos/mL em RPMI completo. Essa suspensão foi utilizada no ensaio citotóxico e no bioensaio para avaliação dos análogos da Pentamidina.

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





**Avaliação citotóxica:** A suspensão de macrófagos ( $10^5$  macrófagos/mL), descrita no subitem anterior, foi distribuído em placas de 96 poços, com volume final por poço de 100  $\mu$ L. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, e então o sobrenadante de cada poço substituído por soluções dos análogos da Pentamidina (52AF e 56AF) em um gradiente de concentrações de 75,00 a 0,59  $\mu$ g/mL, preparadas em RPMI (+10% SBFi e 50  $\mu$ g/mL de gentamicina). Foi utilizado como controle positivo o Isetionato de Pentamidina (75,00 - 0,59  $\mu$ g/mL) e como negativo, solução salina. As placas foram submetidas a nova incubação a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> por 24 e 48 horas. Após cada período de incubação, era adicionado, a cada poço, 10  $\mu$ L de Alamar Blue e, após incubação por 2 horas, a placa teve as absorbâncias avaliadas por espectrofotometria em leitor de placas, utilizando comprimento de onda de 540 nm. O valor observado no controle negativo foi utilizado com referência de 100% de viabilidade celular, para fins comparativos entre os demais tratamentos.

**Obtenção de amastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*:** A suspensão de macrófagos ( $10^5$  macrófagos/mL), descrita anteriormente, foi distribuída em placa de cultivo celular de 24 poços, contendo lamínulas de vidro estéril, e submetidas à incubação à 37°C/5%CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após incubação o volume dos poços foi descartado, mantendo-se apenas as lamínulas onde os macrófagos estavam aderidos (Da Silva *et al.*, 2009). A cada poço foi adicionada 1 mL de suspensões celulares de promastigotas de fase estacionária ( $10^6$  parasitos/mL) obtidas de cultivo de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* em RPMI completo, os quais foram mantidos por 2 horas incubadas a 34°C/5%CO<sub>2</sub>, para infecção e desenvolvimento das amastigotas. Após infecção os volumes dos poços foram desprezados, permanecendo apenas as lamínulas com macrófagos, agora parasitados (De Lima *et al.*, 2012).

**Bioensaio contra amastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*:** Soluções preparada a partir dos análogos da Pentamidina em RPMI (+10% SBFi) foram adicionados aos poços (1 mL/poço), onde cada composto, e o controle positivo, foram avaliados em até três concentrações diferentes (0,050, 0,025 e 0,013  $\mu$ mol/mL), além do controle negativo, com solução salina. As placas foram incubadas por 24 e 48 horas, quando os sobrenadantes eram descartados e as lamínulas coradas com o Kit *Panótico Rápido LaborClin*<sup>®</sup> (De Lima *et al.*, 2012). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado do tratamento é a média observada entre elas. As concentrações foram definidas com base em resultados anteriores contra promastigotas e o citotóxico.



**Avaliação da eficiência dos análogos da Pentamidina contra amastigotas de *Leishmania* spp.:** As lamínulas obtidas ao final do bioensaio foram avaliadas sob microscopia óptica, em aumento de até 1000x, onde foi avaliado o percentual de macrófagos parasitados e o número médio de formas amastigotas intracelulares por macrófagos em cada tratamento e nos controles (Torres-Santos *et al.*, 1999).

**Avaliação estatística:** Os resultados obtidos foram submetidos a Análise de Variância – ANOVA ( $p < 0,05$ ) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando o software GraphPadPrism 5.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Pentamidina (Pentacarinat<sup>®</sup>), controle positivo, assim como seus análogos, se mostraram tóxicos nas maiores concentrações propostas, após exposição de macrófagos murinos a 24 e 48 horas (figura 1). Os dados sugerem uma menor toxicidade do controle positivo e do 52AF em relação ao 56AF, após 24 horas, não havendo diferença significativa entre os dois primeiros em nenhuma das concentrações testadas (Tukey,  $p < 0,05$ ). Quando a exposição é prologada até 48 horas há um indicativo de menor toxicidade do 56AF em relação ao outro análogo, nas concentrações superiores a 2,35 µg/mL, não havendo diferença significativa entre eles nas concentrações menores que esta (Tukey,  $p < 0,05$ ), mas ambos mostrando caráter mais citotóxico que o Pentacarinat<sup>®</sup>, em todas as concentrações inferiores a 37,5 µg/ml (figura 1).

Em experimentos *in vitro*, Batista (2009) avaliou a atividade das diamidinas aromáticas sobre as formas intracelulares do *Trypanosoma cruzi* e as tripomastigotas sanguíneas. Os estudos revelaram a baixa toxicidade dos compostos sobre as células sanguíneas e atividade tripanocida sobre ambas as formas testadas. O sucesso do estudo está diretamente relacionado a estrutura química dos compostos. Os resultados do ensaio sugerem a necessidade de busca por análogos diamidínicos com atividades menos tóxicas e mais eficazes contra protozoários.



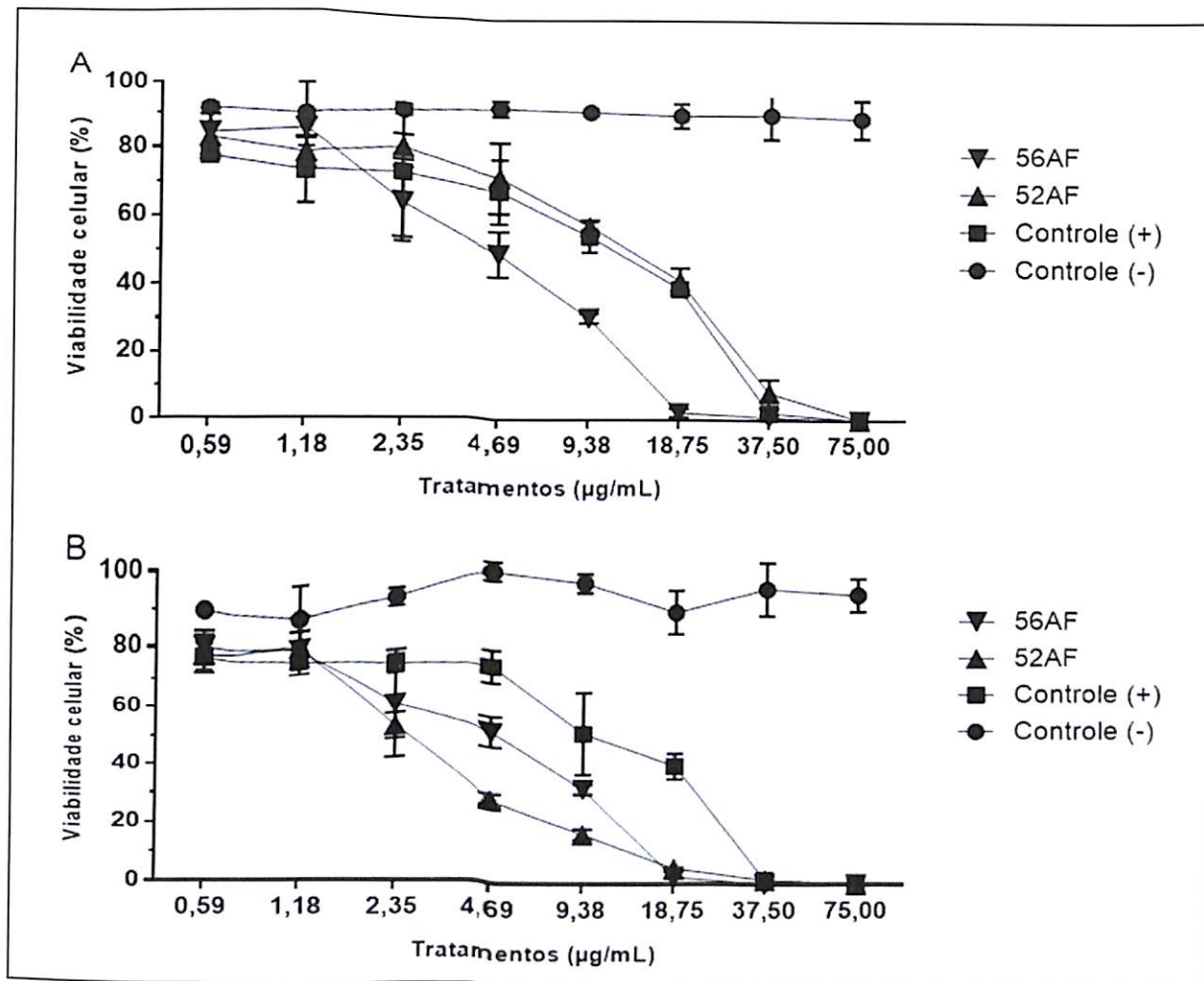


Figura 1: Viabilidade celular de macrófagos peritoneais murinos após exposição, 24 horas (A) e 48 horas (B), a Pentamidina e análogos fluorados. (Dados inclusos na tese do doutorando Pedro Rael Cândido Domingos).

As substâncias testadas mostraram efeito sobre os amastigotas das duas espécies de *Leishmania* testados, mas com redução na taxa de infecção maior quando os macrófagos eram parasitados por *L. guyanensis*, sugerindo um efeito maior sobre essa espécie (figura 2). Segundo Neves *et al* (2011), a Pentamidina possui eficácia de 58,1% contra a espécie *L. guyanensis* e 60,3% sobre outras espécies, sugerindo a vantagem de ser utilizada em menor tempo de tratamento. Dos análogos testados o 56AF se mostrou mais eficaz contra *L. amazonensis* após 24 horas e contra *L. guyanensis* em 48 horas, não havendo diferença significativa entre eles nos outros cenários. Com exceção do Pentacarinat® a 0,050



$\mu\text{mol/mL}$ , não foi observado diferença significativa entre esse controle e os análogos em teste (figura 2).

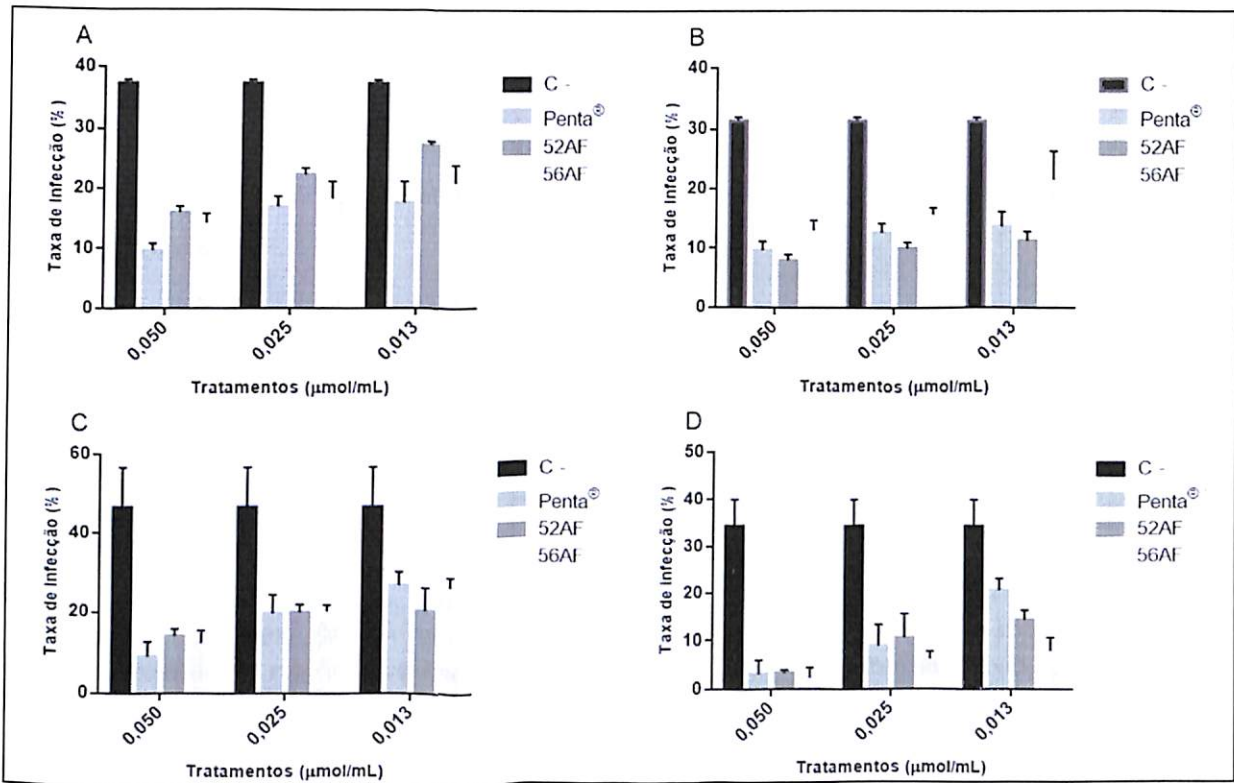


Figura 2: Taxa de infecção de macrófagos murinos por *L. amazonensis* (A e B) e por *L. guyanensis* (C e D), após exposição a diamidínicos por 24 (A e C) e 48 (B e D) horas. C - = controle negativo; Penta® = Pentacarinat® (Dados inclusos na tese do doutorando Pedro Rael Cândia Domingos).

Bakunova e cols (2009) avaliaram 65 análogos para atividades antiprotozoárias, dos quais oito compostos exibiram atividade igual ou melhor que a Pentamidina, leishmanicida usado no teste. Soeiro e cols (2013), observaram que as moléculas que contêm diamidinas em sua composição química apresentam atividade *in vitro* contra *Leishmania* e *Trypanosoma*, bem como as amidinas reversas, as quais possuem amplo espectro contra microrganismos intracelulares.



## CONCLUSÃO

Os análogos avaliados se mostraram tóxicos em concentrações maiores para os macrófagos murinos, com gradual redução da toxicidade quando reduzida a concentração. Além disso, a taxa de infecção por amastigota de *L. amazonensis* teve maior redução no tratamento com 52AF, enquanto amastigotas de *L. guyanensis* reduziram em ambos os tratamentos. Os análogos fluorados mantiveram atividade antileishmânica similar a Pentamidina. Estudos complementares em modelos animais são necessários para avaliar possível toxicidade dessas substâncias e demonstrar sua potencialidade terapêutica *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- Almeida, OLS; Santos, JB. 2011. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(3):497-506.
- Bakunova, SM., Bakunova, SA., Patrick, DA., Kumar, EVKS., Ohemeng, KA., Bridges, AS., Wenzler, T., Barszcz, T., Jones, Sk., Werbovetz, KA., Brun, R., Tidwell, RR. 2009. Estudo de atividade estrutural de análogos de Pentamidina como agentes antiprotozoários. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2009, 52(7), 2016-2035p.
- Basano, SA; Camargo, LMA. 2004. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. Vol. 7, Nº 3, p. 328-337.
- Batista, DGJ 2009. *Estudos in vitro e in vivo da atividade biológica de fluorquinolonas, tiossemicarbazona, diaminidinas aromáticas e arilimidaminas sobre Trypanosoma cruzi*. Tese de doutorado, Instituto Osvaldo Cruz, Pós- graduação em biologia parasitária, Rio de Janeiro, 202p.
- Da Silva, ACV; Nery, LCR; Figueira, LP; Moreira, FRACN; Franco, AMR. 2009. Avaliação “in vitro” da infectividade de amostras de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. 61<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPC. (<http://www.sbpcnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/5087.htm>). Acesso em 31/01/2017.
- De Lima, JPS; Pinheiro, MLB; Santos, AMG; Pereira, JLS; Santos, DMF; Barison, A; Silva-Jardim, I; Costa, EV. 2012. *In Vitro* Antileishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Revista. Virtual de Química*. 4(6), p.692-702.
- Gontijo, B; Carvalho, MLR. 2003. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36(1):71-80.
- Lima, EB, Porto, C; Motta, JOC. Da; Sampaio, RNR. 2007. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 82(2), 111–124.



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
Coordenação de Capacitação  
Divisão Apoio Técnico

Maciejewska, D.; Jerzy, Z.; Pawel, K.; Mateusz, R.; Barbara, K.S.; Margaret, S.C.; MCellan, T. Analogs of pentamidine as potential anti-Pneumocystis chemotherapeutics *European Journal of Medicinal Chemistry* 46 (2012) 164-173.

Neves, L.O., Talhari, A.C., Gadelha, E.P.N., Silva Júnior, R.M., Guerra, J.A.O., Ferreira, L.C.L., Talhari, S. 2011. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(6), 1092-1101.

Pinheiro, RO. 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana : mecanismos imunológicos , tratamento e profilaxia. *Infarma*. V.16: 79–82

Soeiro, M.N.C.; Werbovetz, K.; Boykin, D.W.; Wilson, W.D.; Wang, M.Z.; Hemphill, A. 2013. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. *Parasitology*, 140(8).

SVS; Ministério da Saúde. 2014. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2014. (<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/24/LTA-Casos-14.pdf>). Acesso em 19/01/2017.

SVS;. Ministério da Saúde. 2009. Leishmaniose Tegumentar Americana - Guia de Vigilância Epidemiológica., *Caderno* 11(7), 1–30. ([http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_epidemiologica\\_7ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf)). Acesso em 31/01/2017.

SVS; Ministério da Saúde. 2010. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. ([http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar\\_americana.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf)). Acesso em 20/01/2017.

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

