

Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Medicina Tropical

RICARDO VIEIRA GONÇALVES

Evidências clínicas e imunológicas da eficácia do
tratamento da leishmaniose cutânea com baixas
doses de antimonial pentavalente na manutenção
de cura por longo tempo

Orientadora: Alda Maria Da-Cruz

Coorientador: Manoel Paes Oliveira-Neto

Rio de Janeiro

2014

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Medicina Tropical

**Evidências clínicas e imunológicas da eficácia do tratamento da
leishmaniose cutânea com baixas doses de antimonial
pentavalente na manutenção de cura por longo tempo**

Autor: Ricardo Vieira Gonçalves

Orientadora: Alda Maria Da-Cruz

Coorientador: Manoel Paes Oliveira-Neto

Banca examinadora:

José Rodrigues Coura, IOC – FIOCRUZ/RJ
(Presidente da banca)

Fátima Conceição Silva, IOC – FIOCRUZ/RJ

Marise da Silva Mattos, IPEC – FIOCRUZ/RJ

Paulo Roberto Lima Machado, HUES - UFBA

Luna Azulay-Abuláfia, FCM – UERJ/RJ

Danuza Almeida Esquenazi, IOC- FIOCRUZ/RJ
(Suplente)

Jaqueline Anita Menezes – HSE/RJ
(Suplente)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente a todos aqueles que, simplesmente, acreditaram.

Agradeço a Deus por ter permitido que eu chegasse até aqui, me dando sabedoria e capacidade de discernimento para as melhores escolhas.

Agradeço à minha mãe, Adelia, simplesmente por ser o que ela sempre foi: uma verdadeira MÃE! Deixo aqui o meu MUITO OBRIGADO! Paulo, eu lhe agradeço aqui, em conjunto à minha mãe, por tudo o que fez por mim. O carinho e os sentimentos de pai são mais importantes que qualquer coisa nessa vida.

Agradeço aos meus irmãos, Marcelo e Luciene, pela amizade profunda que temos.

Agradeço aqui também aos meus queridos sobrinhos e afilhados, Caio e Thales.

Agradeço ao meu pai, Heitor, pelo apoio e incentivo na minha profissão, e pelo carinho e presença em minha vida. Agradeço também a Rita, e aos meus irmãos caçulas, Gustavo e Bernardo por também fazerem parte disso tudo.

Agradeço ao Rodrigo, por ter estado ao meu lado nestes momentos finais tão difíceis, e pelo apoio e companheirismo incondicionais. Pela vida seguimos em frente. OBRIGADO!

Agradeço a amiga Alda, por esses primeiros e breves, quatorze anos de uma amizade tão sincera e bonita. Nisso fui agraciado com a sabedoria e capacidade de discernimento citados acima também. Muito obrigado.

Agradeço a minha orientadora, Alda Maria Da-Cruz, que foi a primeira a acreditar no meu avanço acadêmico, me dando a primeira oportunidade, desde o PIBIC, até a defesa desta tese. Os ensinamentos científicos e o seu exemplo de profissionalismo e prazer em pesquisar foram os alicerces que me conduziram até aqui. Muito obrigado!

Agradeço ao meu co-orientador, Manoel Paes de Oliveira Neto. Com a oportunidade de aprender a seu lado, absorvi não apenas conhecimentos médico-científicos, mas também ensinamentos que levarei sempre comigo. Sua obra no campo da leishmaniose é, a meu ver, uma obra de arte. Se fosse para citar “arte”, a música clássica poderia ser usada como comparação. Obrigado, Manoel.

Ao Renato, por ter me incentivado, estimulado e ajudado a retornar ao meio acadêmico.

Ao Ricardo Nogueira, sempre fundamental em tudo o que eu fiz em termos de pesquisa. Obrigado, meu amigo!

Ao Adriano e à Joanna, por terem sido meus “dois braços direitos” neste projeto.

Pela amizade e empenho em ajudar, e também por todos os ensinamentos.

A Carol, por toda a ajuda com os experimentos.

Meus primos Rafael e Michele, que sabem que também são meus irmãos!

A minha tia e madrinha Maria da Glória, que sempre soube me roubar um sorriso!

Ao meu tio e padrinho Pedro, por ser parte de minha vida também.

Às amigas Aline Pereira, Ana Luiza Aguiar e Ana Paula Streck: pela amizade!

A TODOS os amigos do laboratório: Eduardo, Raquel, Gisele, Milene, Maria, Luzinei, Elaine, Andréia. Cada momento compartilhado com vocês será sempre lembrado com muito carinho.

À Rosa Plácido, por manter o bom funcionamento do laboratório, o que permitiu todos os experimentos realizados. E, claro, pela amizade também!

À minha aluna de PIBIC, Julia Heringer, além da amizade, peça fundamental para o mapeamento dos casos estudados neste trabalho.

A todo o grupo de trabalho do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, pelo exemplo de determinação para se conseguir o que se quer.

Ao Laboratório de Imunoparasitologia, onde iniciei como aluno de IC.

Ao Sérgio Coutinho, pela orientação durante o PIBIC, e pelo exemplo de profissionalismo.

À Claude Pirmez, mais um grande exemplo de pesquisadora!

À Marise Mattos, pelos ensinamentos iniciais sobre leishmaniose, que foram os pilares iniciais a este trabalho.

À Rosimar Batista, pelas reações de PCR.

À Andréa Pons e à Cynthia Cascabulho, por todo auxílio nas análises citofluorimétricas.

Ao Guilherme Werneck, pela orientação com os cálculos estatísticos.

À Maria Inês Pimentel e à Ana Nilce Elkhoury, pela colaboração em relação ao estudo de incidência de pacientes co-infectados com leishmaniose e HIV.

Ao setor de Transporte do IOC/FIOCRUZ, e a todos os motoristas que nos guiaram pelas estradas em busca de nossos casos para estudo, em especial ao Tadeu Chermont e ao motorista Mauro, que fez a maior parte das visitas de campo.

À equipe de Vigilância em Saúde Pública de Paraty.

Ao Alexandre Chieppe, e a toda a equipe de Vigilância Epidemiológica e Ambiental, da Secretaria de Vigilância e Saúde do Estado do Rio de Janeiro.

Ao suporte financeiro do projeto CNPq, Faperj e CAPES, à Wilma Hottes, pela administração destes recursos, e à CAPES e ao CNPq, pela bolsa de doutorado.

À coordenação e a toda equipe da Pós-Graduação em Medicina Tropical.
E, finalizando, gostaria de fazer um agradecimento especial a todos os pacientes que, de forma voluntária, concordaram em participar deste projeto, permitindo assim a sua realização. Deixo aqui o meu muito obrigado!

PREFÁCIO

Esta tese está organizada da seguinte forma:

1 - INTRODUÇÃO

1.1 História da leishmaniose tegumentar Americana no Estado do Rio de Janeiro (RJ): foi realizado um levantamento da literatura científica e cinzenta versando sobre a ocorrência da leishmaniose tegumentar no RJ. Foram descritos eventos históricos da doença desde os primeiros rumores de sua existência no RJ, passando pelos surtos ocorridos no século XX, até os dias atuais.

1.2: Aspectos epidemiológicos, clínicos, laboratoriais e terapêuticos da leishmaniose tegumentar Americana.

2 - JUSTIFICATIVA

3 - OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4 – METODOLOGIA: nesta sessão é citada a metodologia utilizada no estudo de forma sucinta e as estratégias laboratoriais empregadas, cujas técnicas serão detalhadas nos manuscritos que se seguirão.

5 – RESULTADOS: os resultados desta tese encontram-se descritos na sessão “RESULTADOS”, nos sub-itens “Casuística”, “Manuscrito I” e “Manuscrito II”. No item “Casuística” foram descritas as atividades desenvolvidas nos trabalhos de campo e as estratégias de busca ativa dos pacientes estudados, abordando também a distribuição espacial dos casos. Os manuscritos I e II complementam a sessão “Metodologia”. Estes dois manuscritos serão submetidos para publicação.

O primeiro deles (Manuscrito I) compara clínica e imunologicamente a eficácia de manutenção de cura a longo prazo do tratamento com antimonial pentavalente em doses baixas de 5mg/kg/dia por 30 dias em relação ao tratamento com doses convencionais de 15mg/kg/dia, de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde vigentes na época em que estes pacientes foram tratados.

O Manuscrito II avalia a eficácia de manutenção de cura a longo prazo do tratamento

da LTA com esquemas alternativos de aplicação intralesional ou utilização de uma ampola três vezes por semana até a cura clínica.

6 – DISCUSSÃO: nesta são discutidos os resultados gerais obtidos e descritos nos dois manuscritos em preparação.

7 – CONCLUSÕES

8 – ANEXOS: nesta sessão são incluídos dois anexos. O primeiro deles (ANEXO I) é um artigo publicado em 2012 no periódico “Parasite Immunology”, onde sou co-autor. Neste artigo foram estudados os níveis de imunoglobulinas tipo IgG e isotipos em pacientes tratados e curados de LTA.

O segundo anexo (ANEXO II) relata os resultados do cruzamento de dados dos sistemas de registro oficiais dos casos de associação LTA e HIV/aids em pacientes notificados no Estado do Rio de Janeiro, para estas duas doenças. Este trabalho foi realizado através de análise dos casos notificados pelo SINAN, no período de 1998 a 2010 no RJ.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1- História da leishmaniose tegumentar Americana no Estado do Rio de Janeiro.....	1
1.2 - Aspectos epidemiológicos, clínicos, laboratoriais e terapêuticos da leishmaniose tegumentar Americana.....	9
2 – JUSTIFICATIVA.....	14
3 – OBJETIVOS.....	16
3.1 – Objetivo geral.....	16
3.2 – Objetivos específicos.....	16
4 – METODOLOGIA.....	17
4.1 – Trabalhos de campo e estudos clínicos.....	17
4.1.1 – Plano de recrutamento	17
4.1.2 – Investigação clínico-epidemiológica	18
4.1.3 – Critérios de inclusão	18
4.1.4 – Critérios de não-inclusão.....	18
4.1.5 – Critérios de exclusão	18
4.2 – Estratégias para avaliações laboratoriais.....	19
4.3 – Análises estatísticas.....	19

5 – RESULTADOS.....	20
5.1 – Casuística.....	20
5.2 – Manuscrito I (submetido) – estudo comparativo dos pacientes de doses de 5 mg Sb ⁵⁺ /kg/dia comparados aos pacientes de doses regulares: eficácia dos tratamentos	28
5.3 – Manuscrito II (em preparação) – estudo dos pacientes tratados com doses intralesionais e em esquema de uma ampola de Sb ⁵⁺ três vezes por semana até a cura clínica: eficácia dos tratamentos	48
6 – DISCUSSÃO FINAL.....	60
7 - CONCLUSÕES.....	63
8 – ANEXOS.....	65
8.1 –Anexo I: Artigo publicado.....	65
8.2 – Anexo II: Análises dos casos notificados entre 1998 e 2010 de pacientes com associação leishmaniose tegumentar Americana e HIV/AIDS no Rio de Janeiro.....	71
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS – do inglês, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - aids
BD – baixas doses de 5 mg/kg/dia de antimonial pentavalente
BSBD - Boletim da Sociedade Brasileira de Dermatologia
CL – do inglês, leishmaniose cutânea
DR – doses regulares de 15 mg/kg/dia de antimonial pentavalente
DNA – do inglês, ácido desoxirribonucleico
DO - densidade óptica
HIV - vírus da imunodeficiência humana
IDRM - reação intradérmica de Montenegro
IFN- γ - interferon gama
IgG - imunoglobulina tipo G
IL – intralesional
IL-2 - interleucina dois
IL-4 - interleucina quatro
IL-6 - interleucina seis
IL-10 - interleucina dez
IPEC - Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas
IRIS – do inglês, Síndrome inflamatória da reconstituição imune
LC - leishmaniose cutânea
LCD - leishmaniose cutâneo-difusa
Ldiss - leishmaniose disseminada
LipMED - Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas
LM - leishmaniose mucosa
LMC - leishmaniose mucocutânea
LowD – do inglês, baixas doses
LTA - leishmaniose tegumentar Americana
ML – do inglês, leishmaniose mucosa
MS - Ministério da Saúde
OMS - Organização Mundial da Saúde
OPAS - Organização Panamericana para Saúde
PBMC – do inglês, células mononucleares do sangue periférico
PCR – do inglês, reação em cadeia da polimerase
RegD – do inglês, doses regulares
RJ - Estado do Rio de Janeiro
Sb⁵⁺ - antimonial pentavalente
SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde
SUS – Sistema Único de Saúde
TARV - terapia antirretroviral
Th1 - perfil imunológico tipo 1
Th17- perfil imunológico tipo 17
Th2 - perfil imunológico tipo 2
TNF - fator de necrose tumoral
WHO – do inglês, Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos de leishmaniose tegumentar Americana notificados no Estado Rio de Janeiro no período de 1985-2012.....	5
Figura 2. Distribuição espacial de casos de leishmaniose tegumentar Americana residentes em municípios do Estado do Rio de Janeiro, atendidos no Instituto de Pesquisa Clínicas Evandro Chagas/FIOCRUZ.....	21
Figura 3. Distribuição espacial dos casos de leishmaniose em relação à cobertura vegetal.....	22
Figura 4. Distribuição espacial dos pacientes incluídos e excluídos do estudo.....	22
Figura 5. distribuição espacial dos casos ao redor dos maciços montanhosos de Gericinó e Pedra Branca.....	23
Figura 6. Aglomerado de casos na fronteira do maciço montanhoso/cidade, observado no Município de Mesquita	24
Figura 7. Distribuição espacial dos casos de leishmaniose no Município de Paraty.....	25
Figura 8. Distribuição espacial dos casos de leishmaniose no Município de Paraty em relação à cobertura vegetal.....	25
Figura 9. Distribuição espacial final dos pacientes analisados, nos municípios do Estado do Rio de Janeiro.....	26

Figuras do manuscrito I:

Figura 1: Lesões ativas de leishmaniose cutânea antes do tratamento e manutenção de cura a longo prazo nos pacientes tratados com doses baixas de antimonial pentavalente.....	37
--	----

Figura 2: Perfil de produção de citocinas em resposta ao estímulo com antígeno de <i>Leishmania</i> longo tempo após o tratamento	40
---	----

Figura do manuscrito 2:

Figura 1: distribuição dos 277 casos de pacientes tratados com esquema intralesional e 2 ^a /4 ^a /6 ^a	51
---	----

Figura 2: Lesões cicatriciais de leishmaniose cutânea em pacientes tratados com esquema intralesional ou esquema 2 ^a /4 ^a /6 ^a	55
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Motivos de exclusão de casos procurados após a visita residencial em trabalho de campo nos municípios do Rio de Janeiro e de Paraty.....27

Tabela do Manuscrito I:

Tabela 1: Frequência de negatividade da imunoglobulina G e isotipos anti-*Leishmania* em pacientes clinicamente curados avaliados longo tempo após o tratamento com doses baixas e doses regulares de antimoanial pentavalente.....38

Tabela 2: Avaliação da persistência parasitária pela detecção de DNA de *Leishmania* no sangue de pacientes curados de leishmaniose longo tempo após o tratamento.....39

Tabela 3: Níveis de citocinas presentes nos sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno de *Leishmania*, do sangue periférico de pacientes tratados com doses baixas e doses regulares de antimonial pentavalente, longo tempo após o tratamento.....41

Tabela do Manuscrito II:

Tabela 1: Fatores que levaram à exclusão dos pacientes do protocolo de estudo após terminarem as 18 visitas de campo.....52

Tabela 2: Características clínicas durante a fase ativa da leishmaniose cutânea dos pacientes tratados com os esquemas intralesional ou em esquema de tratamento três vezes por semana até a cura clínica53

RESUMO

O tratamento para leishmaniose cutânea (LC) utilizando antimoniais foi iniciado em 1912, no Brasil. O uso da forma pentavalente (Sb^{5+}) se iniciou na década de 1940, e apesar de ainda ser eficaz para curar a LC efeitos adversos graves podem acontecer. Outras opções de tratamento, como pentamidina e anfotericina B também são de administração parenteral. Na tentativa de reduzir os efeitos adversos dos Sb^{5+} , esquemas terapêuticos em doses baixas já evidenciaram ser seguros no tratamento da LC no Rio de Janeiro, sejam doses de apenas 5mg Sb^{5+} /kg/dia por 30 dias (DB), aplicação intralesional (IL) ou em esquema de uso de uma ampola três vezes por semana ($2^a/4^a/6^a$) até a cura clínica. Apesar das evidências de que doses reduzidas de Sb^{5+} levam à cura após o tratamento, sua eficácia a longo prazo (mais de cinco anos) não é bem estabelecida. Nosso objetivo foi verificar se terapias que utilizaram doses reduzidas de antimonial (5mg Sb^{5+} /kg/dia por 30 dias, IL ou $2^a/4^a/6^a$) foram tão eficazes quanto o uso de doses regulares (15mg Sb^{5+} /kg/dia) (DR) na manutenção de cura da LC mesmo longo prazo após o tratamento. Setenta pacientes curados e tratados para leishmaniose foram analisados e comparados: 37 pacientes (52,8%) no grupo que utilizou DB e 33 (47,2%) no grupo DR. Os dois grupos eram clinicamente similares durante a fase ativa da LC. Todos os pacientes do grupo DB mantiveram-se curados, assim como os do grupo DR, mesmo em períodos tão longos quanto 25 anos após o tratamento. Outros 20 pacientes de tratamento IL e dez de terapia $2^a/4^a/6^a$ também foram avaliados e permaneceram curados em um período de até 27 anos. Durante o exame dermatológico atual, não foram detectadas recidivas ou evolução para forma de leishmaniose mucosa (LM) em nenhum dos grupos. Após um período mínimo de seis anos após o término do tratamento, a detecção de anticorpos IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* demonstrou níveis similares entre os grupos DB e DR. No grupo DB os níveis foram negativos em 74,2% e 83,8% para IgG1 e IgG3, respectivamente, e em 80% nos IL e 85% nos $2^a/4^a/6^a$. A produção de citocinas foi similar entre os grupos DB e DR. Nossos resultados sugerem que o tratamento com doses baixas de antimonial foi tão eficiente quanto o uso de DR na manutenção de cura da LC, mesmo longo tempo após o tratamento.

ABSTRACT

Antimony therapy was first used to treat cutaneous leishmaniasis (CL) in 1912. Pentavalent antimonial (Sb^{5+}) compounds were introduced as leishmaniasis therapy in the 1940s and are still efficient in curing CL, but they may cause serious adverse effects. Although there are other options for CL treatment, such as pentamidine and amphotericin B, similar to Sb^{5+} , these drugs are also administered parenterally. To reduce the adverse effects of antimony, low-dose therapies were attempted and were proven safe in curing CL in patients in the state of Rio de Janeiro. Different schedules as $5\text{mgSb}^{5+}/\text{day}/30$ days (LowD), intralesional therapy (IL), or use of one ampoule three-times-a-week until clinical cure were proven to be efficient to cure CL. Despite evidence that low Sb^{5+} doses lead to a clinical cure soon after therapy, the long-term effectiveness (more than five years) of these low dosages is not well-known. Our goal was to determine whether low-dose therapies (LowD, IL or regimen three-times-a-week) are as effective as regular doses (RegD; 15 mg/kg/day) for the long-term curative maintenance of CL. The medical records of seventy patients who were successfully treated for CL were retrieved and compared: 37 patients (52.8%) were allocated to the LowD group, and 33 patients (47.2%) to the RegD group. Patients in both LowD and RegD groups were clinically similar during active CL disease and all patients remained free of CL for periods as long as 25 years after therapy. Other 20 IL patients and 10 three-times-a-week ones were retrieved, and also remained free of CL even as long as 27 years. During the follow-up clinical examination, neither active lesions nor evolution to mucosal disease was detected. The levels of anti-*Leishmania* IgG1 and IgG3 antibodies, detected after a minimum average time of six years following clinical cure, were similar in LowD and RegD patients. IgG1 and IgG3 titres were negative in 74.2% and 83.8% of patients in the LowD group, respectively. In IL and three-times-a-week groups the levels of IgG1 and IgG3 were also negatives in 80% and 85%, respectively. Cytokine production was similar in both LowD and RegD groups. Our results shown that, the low dose therapies were as efficient as regular dose in the long-term curative maintenance of CL.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 História da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Rio de Janeiro

A leishmaniose tegumentar é doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A doença encontra-se distribuída por toda a zona tropical e subtropical do planeta e é considerada endêmica em 98 países (Organização Mundial da Saúde - OMS 2013). No continente Americano a forma da doença que compromete pele e mucosas é denominada leishmaniose tegumentar Americana (LTA). As diferentes espécies de *Leishmania* com tropismo pelo tegumento, responsáveis pela infecção no homem são agrupadas nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. As principais espécies identificadas no Velho Mundo são a *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica*, enquanto nas Américas são encontradas a *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (L.) mexicana*.

Nas Américas, Brasil e Colômbia são os países que registraram o maior número de casos nos últimos anos, apesar de a doença ocorrer desde o México até o norte da Argentina (OMS 2013). No Brasil, as principais espécies envolvidas são a *L. Braziliensis* (Lb), *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, sendo a primeira delas a mais importante pela frequência e distribuição no Novo Mundo. Todos os 26 Estados brasileiros registram casos da doença e, em termos de ordem de frequência, as áreas de maior endemicidade são: Norte, Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul. A região Sudeste é composta por quatro estados, que juntos representam 9,5% de todos os casos de LTA registrados do Brasil, onde o Estado do Rio de Janeiro (RJ) é o responsável por 9% dos casos, com 2.279 casos registrados entre os anos de 2001 e 2013 (SINAN 2014).

Diversas publicações descrevem as principais características clínicas, imunológicas e epidemiológicas da LTA (Da-Cruz & Pirmez 2013). No entanto, há uma lacuna no conhecimento sobre a trajetória histórica da LTA no RJ. O entendimento da evolução epidemiológica da infecção/doença, e dos fatores que contribuíram para o surgimento de áreas endêmicas e por vezes de surtos são fundamentais para a compreensão da dinâmica da transmissão e estabelecimento da doença no Estado.

Dois interessantes relatos históricos da LTA no Brasil foram descritos por Rabello (1925), e por Vale & Furtado (2005). Em relação ao RJ, Marzochi e cols. 2009 realizaram uma revisão sobre o foco de leishmaniose visceral de caráter autóctone verificado em 1977 e que durou duas décadas até o controle da transmissão.

No entanto, em relação à LTA no RJ, muitos aspectos interessantes ainda precisam ser aprofundados.

Realizamos uma revisão do histórico da leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro, através de um relato descritivo desde os primeiros indícios da presença da LTA no Estado, até a atualidade. Para tal, realizou-se uma revisão do tema incluindo literatura científica (artigos publicados) e literatura cinzenta (anais de reuniões acadêmicas, boletins de reuniões de sociedades médicas, teses/dissertações), bem como relatos de experiências pessoais.

O registro mais antigo sobre possíveis lesões de leishmaniose foi realizado por Rabello (1925). O autor estudou seis representações em cera de pacientes portadores de lesões na face, pertencentes à Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro (Clínica do Prof. Gabizo). Apesar de estes modelos estarem registrados com outros diagnósticos, Rabello sugeriu que estas representações poderiam ser de lesões cutâneo-mucosas de leishmaniose. Como um dos modelos em cera datava de 1882 poder-se-ia supor que neste ano havia casos da doença no RJ, ou seja, ainda no século XIX. No entanto, não fica claro se os pacientes representados nestes modelos seriam ou não casos autóctones do RJ.

Muitos casos registrados de LTA no início do século XX se encontram nos Boletins da Sociedade Brasileira de Dermatologia (BSBD). Em um destes boletins, Rabello (1913) descreveu o caso de um paciente com 34 anos de idade, com a forma mucosa de LTA. Este paciente relatava ter tido uma lesão de pele aos 18 anos de idade, ou seja, por volta do ano de 1897, que pode ter sido leishmaniose cutânea. Este fato levanta a hipótese deste paciente ser o primeiro caso clinicamente confirmado de leishmaniose tegumentar no RJ.

Outros relatos de casos de pacientes portadores de lesões cutâneo-mucosas e provenientes do RJ também podem ser encontrados nestes BSBD em 1913 e 1914:

- a) Marinho (1913) descreve um caso proveniente de Jacarepaguá com forma mucosa, caracterizada por ulcerações e infiltração no lóbulo do nariz e mucosa nasal;

- b) Rabello (1913) descreve o caso de um paciente de 30 anos, com numerosas lesões ulceradas disseminadas por cabeça, tronco e membros.
- c) Terra (1913) relata um paciente com lesões vegetantes e papilomatosas confluentes nas pernas;
- d) Machado (1913) apresentou o caso de uma paciente com lesões no lábio superior e asas nasais bastante infiltradas, que contraiu a doença no RJ três anos antes do diagnóstico;
- e) Dutra e Silva (1914) menciona o caso de um paciente residente no bairro da Gávea na cidade do Rio de Janeiro;
- f) Marinho (1914) descreve o caso de uma paciente com lesão mucosa, embora houvesse a dúvida se a infecção ocorreu no RJ, ou em Bauru (São Paulo), local em que a referida paciente residiu por alguns anos.

No ano de 1911, Gaspar Vianna, no Instituto de Manguinhos (atual Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ/RJ) fez a primeira descrição de um parasito que ele julgou pertencer ao gênero *Leishmania*, mas que possuía características de uma nova espécie, tendo então criado a denominação de *L. braziliensis* (Vianna 1911). Posteriormente, formas amastigotas deste parasito foram descritas pelo mesmo autor (1913) em um corte histopatológico de lesão ulcerada no focinho de um cão proveniente do Rio de Janeiro, o que já aponta para o possível papel deste animal como reservatório doméstico da infecção desde esta ocasião.

Dutra e Silva (1915) relata a ocorrência da doença em outros bairros da cidade do Rio de Janeiro, como Jacarepaguá e Laranjeiras, bem como nas cidades de Angra dos Reis, Campos, Cantagalo, Carmo, Itacuruçá, Itaocara, Macaé, Mangaratiba, Maricá, Porto das Flores e São José da Boa Morte.

Ainda na primeira metade do século XX, temos o primeiro surto descrito de LTA do RJ, ocorrido no ano de 1921 (Aragão, 1927), na região então conhecida como Águas Férreas, nas proximidades do bairro de Laranjeiras, com 50 casos registrados. Foram afetados não somente trabalhadores rurais, mas também outros profissionais considerados urbanos, como médicos e advogados. Esta pode ter sido a primeira descrição de um surto peri-urbano da doença no RJ.

No ano de 1922, Cerqueira & Vasconcelos descreveram um surto da doença na cidade do Rio de Janeiro, na região de Santa Tereza, bairro localizado muito próximo ao centro da cidade. Neste trabalho, os autores descreveram 23 casos de

leishmaniose cutânea e três casos de pacientes com lesões mucosas, com uma descrição detalhada dos casos e de sua ocorrência geograficamente progressiva no referido bairro. Neste período, Aragão capturou flebotomíneos desta região da cidade, e reproduziu lesões de LTA no nariz de um cachorro, após inocular um macerado destes insetos no focinho do animal (Aragão 1927). No entanto, não houve sucesso nos experimentos repetidos subsequentemente.

Avançando-se no tempo, já para a segunda metade do século XX, mais precisamente em 1952, a tese de Livre Docência do Prof. Rubem Azulay, versando sobre a leishmaniose, detalhou a evolução clínica e terapêutica de 16 casos de LTA. Destes, dois casos eram provenientes da região Oeste da cidade do Rio de Janeiro, sendo um de Santa Cruz e outro de Jacarepaguá, e ainda um caso da região dos Lagos (Saquarema ou Maricá). Nery-Guimarães (1955) descreveu um surto de 35 casos de lesões cutâneas e quatro casos de lesões mucosas ocorridas em 1955 no Município de Magé, localizado na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro.

Somente 19 anos depois, em 1974, encontra-se outra descrição da LTA. Menezes e cols. relataram 17 pacientes da cidade de Cordeiro, região Serrana do RJ, incluindo crianças menores de 12 anos de idade. Este fato reforça os achados de Aragão (1927), apontando o caráter peridomiciliar de transmissão da doença. No mesmo ano ocorreu um novo surto, desta vez na região de Jacarepaguá, com 161 casos, a maior parte nas encostas do maciço da Pedra Branca (Kawa & Sabroza 2002).

Na região Sul do RJ, uma área endêmica foi descrita por Araújo Filho (1978) na Ilha Grande, Município de Angra dos Reis. Entre os anos de 1961 e 1976 ocorreram 32 casos. No entanto, o autor cita que casos esporádicos já eram conhecidos pelos moradores locais há pelo menos mais de 30 anos.

A região metropolitana do Rio de Janeiro se mantém como uma área de importância epidemiológica. Oliveira-Neto e colaboradores em 1988 descreveram a ocorrência da doença em 105 pacientes na região onde atualmente está instalado o Município de Mesquita, importante área endêmica do RJ na década de 1980.

Estudos da fauna flebotomínica feitos desde o início do século XX, (Aragão, 1927) até os dias atuais identificaram a espécie *Lutzomyia intermedia* como a principal encontrada (Aguiar et al. 1987 e 1993, Oliveira et al. 1998, Brazil et al. 2011, Rodrigues et al. 2013) em diversas regiões do RJ.

A LTA é considerada endêmica em todo o RJ, onde ocorre em surtos periódicos, apesar do número de casos estar em declínio (Figura 1).

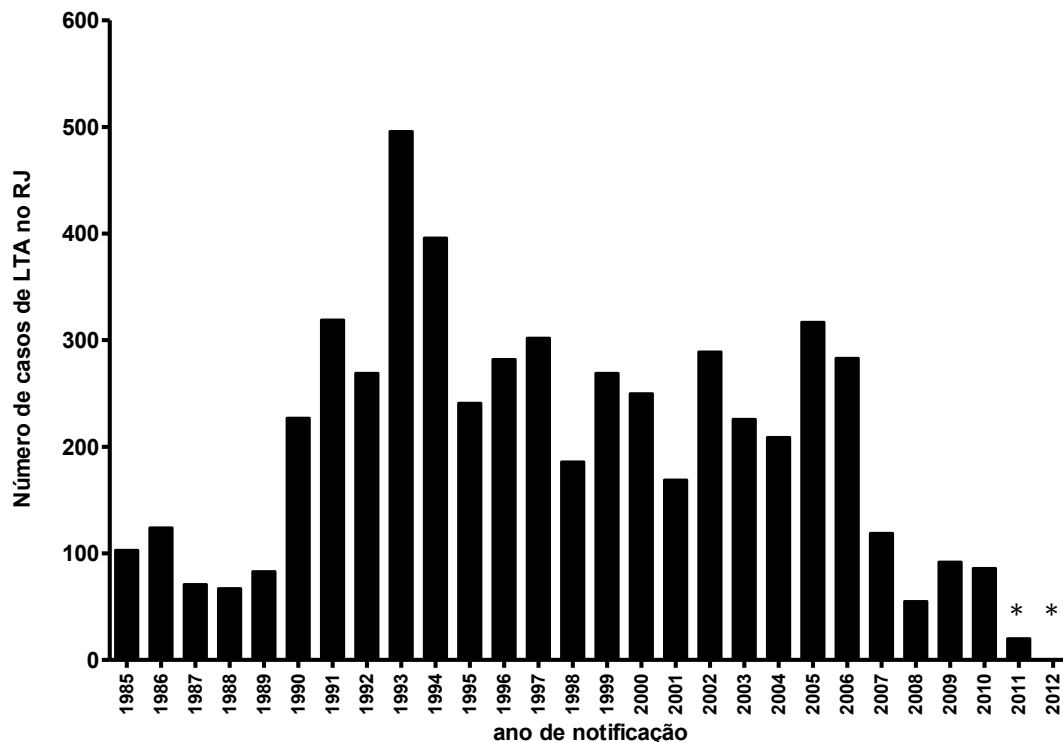


Figura 1 – Números de casos de leishmaniose tegumentar Americana notificados no Estado Rio de Janeiro no período de 1985-2012. Fontes: Secretaria de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde, Brasil; Oliveira-Neto et al. 2000. * dados sujeitos a atualização.

Estima-se que o número de indivíduos infectados por *L. braziliensis*, mas que não desenvolveram a doença seja bem mais elevado do que de casos notificados. A presença de indivíduos assintomáticos já foi demonstrada por inquérito epidemiológico realizado na região de Jacarepaguá (Souza et al. 1992). Nos indivíduos residentes nesta área a positividade da reação intradérmica de Montenegro foi de 8,9%. Este fato corrobora a provável circulação do parasito na região. Indivíduos assintomáticos desta mesma região também foram estudados por Bittar e cols. (2007), assim como avaliações de indivíduos assintomáticos foram realizadas no sul do Estado, na cidade de Paraty (Barbosa 2001).

Em 1987, foi descrito no Rio de Janeiro o primeiro caso mundial de um paciente com leishmaniose tegumentar co-infectado pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (Coura et al. 1987). Posteriormente outros casos de associação LTA e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV/AIDS) foram descritos, onde novos aspectos imunopatológicos da LTA passaram a ser observados: lesões disseminadas, leishmaniose mucosa rica em parasitos, lesões atípicas e até mesmo apresentações comuns da LC (Machado et al. 1992, Mattos et al. 1998, Da-Cruz et al. 1999) e, mais recentemente, manifestações dermatológicas atípicas de

leishmaniose visceral (Santos-Oliveira et al. 2011) e síndrome inflamatória de reconstituição imune (IRIS) (Dirce Bonfim, comunicação pessoal). Embora as evidências apontassem para o surgimento de grande número de casos em função da expansão da epidemia de HIV/AIDS, curiosamente não vem ocorrendo um aumento de registros. Em um levantamento de casos, realizado com base em dados de registro oficiais (sete casos) e informações pessoais (três), chegamos a um número de 10 casos ocorridos no RJ desde a primeira descrição (ANEXO II).

No último ano do século XX, Oliveira-Neto e cols. (2000) realizaram estudo robusto de LTA no RJ. Foram descritos 753 casos acompanhados no antigo Hospital Evandro Chagas (hoje, Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas), entre os anos de 1985 e 1996. Os autores descreveram 29% dos casos notificados no RJ no mesmo período. Os casos foram oriundos de bairros da cidade do Rio de Janeiro (Campo Grande, Bangu e Realengo) e das regiões de Mesquita e Magé. Os pacientes residiam em encostas dos morros e colinas onde ocorreu intensa devastação da floresta original. A maioria dos casos (87%) era de LC, no entanto houve um percentual de 9,5% de lesões mucosas. Dos casos de LM, 60,9% eram provenientes de outros estados. Por outro lado, os pacientes de lesões cutâneo-mucosas devem ter se contaminado no RJ, tendo em vista dados da anamnese dos casos. Este alto índice de casos de lesões mucosas, considerando a frequência estimada pelo Ministério da Saúde (MS, 2010), que é de 3 a 5% dos casos, pode ser um reflexo do fato de o referido estudo ter sido feito em um grande centro de referência da doença no RJ, que acaba por congrega um maior número de casos de mais difícil diagnóstico e tratamento.

Kawa & Sabroza (2002) estudaram a espacialização da leishmaniose tegumentar no RJ, mostrando a evolução da distribuição geográfica da doença na cidade do Rio de Janeiro ao longo do século XX. Ficou caracterizado que o movimento de urbanização e ocupação do solo, com modificações no processo de trabalho, possibilitou um maior contato entre indivíduos suscetíveis e vetores, como observado no surto de 161 casos na região de Jacarepaguá, em 1974. Toda a região de Jacarepaguá foi uma importante área endêmica nessa época, e foi alvo de inúmeros trabalhos, pois ali a LTA ocorreu por muitos anos em surtos esporádicos, num modelo de transmissão predominantemente peridomiciliar. A vegetação tropical primitiva foi praticamente toda derrubada ao longo dos dois últimos séculos. A área foi progressivamente ocupada por plantações de cana e mandioca, depois pelos cafezais e laranjais até os anos 40 e, finalmente, os bananais. Estas características

persistem até hoje nas encostas do maciço da Pedra Branca, em meio aos parques vestígios da floresta primária e uma crescente população de baixa renda. Na região de Pau da Fome, importante área endêmica deste bairro, estas alterações ambientais e ocupacionais foram responsáveis por transformar o local em um foco de casos, cujo número vem progressivamente diminuindo (Kawa et al. 2010).

Os reais reservatórios da infecção por *Leishmania* no RJ ainda são pouco conhecidos. A presença de cães doentes ou infectados na região de Jacarepaguá é registrada desde a década de 1980 (Coutinho et al. 1985, Pirmez et al. 1988). Um inquérito de leishmaniose canina na região de Paraty identificou 8,8% de positividade nos testes sorológicos (Barbosa et al. 1999). No entanto, o papel destes animais como reservatório da doença ainda é discutido.

A LTA também afeta o extremo sul do RJ, com casos notificados no Município de Paraty desde 1988 (Secretaria de Vigilância em Saúde – Paraty, 2006). Entre 1991 e 1997 foram registrados pela Secretaria de Saúde do RJ, 131 casos neste Município. Destes, Vieira-Gonçalves e cols. (2008) descreveram 71 casos, sendo 69 de LC, e dois pacientes desenvolveram a forma cutânea de lesões múltiplas, também conhecida como leishmaniose disseminada (LDiss). Trinta destes casos puderam ser reavaliados após 10 anos e permaneceram curados. É interessante notar que apesar da região ter a presença de tribos indígenas, não havia casos de LC nesta população, mesmo entre os que habitam em regiões vizinhas aos locais onde havia ocorrência da doença (Barbosa, 2001).

A ocorrência da LDiss causada por *L. braziliensis* tem características clínicas peculiares e o manejo terapêutico pode ser complicado devido à possibilidade de má resposta terapêutica (Turetz et al. 2002, Vieira-Gonçalves et al. 2008). Esta forma clínica não vem sendo alvo de estudos sistemáticos no RJ, embora se saiba que há ocorrência de casos (Santiago et al. 2000, Da-Cruz et al. 2005). O número de casos descritos dessa forma clínica vem aumentando em outros estados, como na Bahia (Jirmanus et al. 2012), devendo-se estar atendo ao aumento de casos também no RJ. Curiosamente foi relatada a existência de *L. amazonensis* em um caso de leishmaniose cutânea-difusa em 2007 (Azeredo-Coutinho et al. 2007), que se constituiu no primeiro e único relato desta espécie no RJ até o momento.

Em resumo, poderíamos concluir que a LTA é uma doença presente no RJ há pelo menos mais de um século. Diversos surtos foram detectados em diferentes áreas endêmicas ao longo de todo o século XX, acompanhando a ocupação

populacional e consequente desmatamento de áreas florestais próximas aos centros urbanos.

Nos dias atuais a doença ainda é frequente no RJ, com uma média anual de cerca de 170 casos nos últimos dez anos (SINAN 2014), apesar da existência de métodos diagnósticos eficazes e terapia específica implementada desde 1912 (Dutra & Silva 1915).

O contínuo estudo da leishmaniose tegumentar em todos os seus aspectos é de grande importância para entender os mecanismos de endemicidade, transmissão e características clínicas e epidemiológicas da doença. Os estudos históricos ocupam posição ímpar nestes aspectos.

1.2 - Aspectos epidemiológicos, clínicos, laboratoriais e terapêuticos da LTA

O Brasil concentra o maior número de casos de LC na América do Sul, com uma incidência de 26.008 casos por ano no período entre 2003-2007, com uma estimativa de 72.800 a 119,600 casos anuais (Alvar et al. 2012). No Brasil, foram registrados 315.670 casos de LTA no período entre 2001 a 2012. No RJ foram registrados 2221 casos, para este mesmo período (SINAN 2014). Estudos realizados no Brasil têm evidenciado as particularidades da LTA em diferentes áreas endêmicas (Oliveira-Neto et al. 2000, Romero et al. 2001, Dorval et al. 2006, Vieira-Gonçalves et al. 2008, Guimarães et al. 2009, Silveira et al. 2009, Cella 2012). A descrição clínica, laboratorial e epidemiológica da LTA nas diversas regiões do país é fundamental para se avaliar diferenças regionais que possam influenciar estratégias de vigilância e terapêutica da doença de maneira setorizada. No RJ a *L. (V.) braziliensis* é a espécie isolada nos casos de LC desde o início da década de 1990 (Grimaldi Jr & McMahon-Pratt 1991).

A LC é a forma clínica mais comum de LTA, e existe uma tendência a evoluir para a cura clínica espontânea (Costa et al. 1987). A lesão ulcerada apresenta contornos definidos, bordas elevadas e infiltradas, fundo com granulações grosseiras e é normalmente indolor. Eventualmente podem existir outras lesões dermatológicas. A forma múltipla de LC, também conhecida como leishmaniose disseminada, caracteriza-se pelo elevado número de lesões, do tipo pápulas fechadas ou acneiformes, raramente ulcerando. Esta forma de LC é causada tanto pela *L. amazonensis* quanto pela *L. braziliensis* (Carvalho et al. 1994). Os casos de LC respondem bem à terapia antimonial, na dependência da área endêmica estudada, sendo incomuns as recidivas. Por outro lado, cerca de 3 a 5% dos casos de LC causados por *L. braziliensis* evoluem para a leishmaniose mucosa (LM) (SVS 2010), uma forma grave e de tratamento mais difícil (Oliveira-Neto et al. 1998). As lesões metastáticas de LM aparecem meses ou anos após um quadro de LC ou mesmo de uma infecção subclínica ou assintomática. Há eritema e discreta inflamação do septo e mucosa nasais, evoluindo para lesões ulceradas ou úlcero-vegetantes. A mucosa oral, faringe e laringe podem ser também envolvidas, e o grau de destruição tecidual é variável.

Como leishmaniose mucocutânea (LMC) designamos a forma clínica que apresenta lesões cutâneas e mucosas ativas e concomitantes. Já a leishmaniose cutânea-difusa (LCD) é uma forma anérgica e rara de LTA causada por *L. amazonensis*. Ocorrem lesões por todo o corpo, com provável disseminação

hematogênica do parasito. Clinicamente caracteriza-se por lesões papulosas, nodulares ou placas infiltradas, sem ulceração, acometendo principalmente a face e os membros. Raramente ocorre comprometimento mucoso. Há riqueza parasitária nas lesões e o teste de Montenegro (IDRM) geralmente é negativo. Esta é uma forma grave da doença, sendo também mais resistente ao tratamento (Da-Cruz & Pirmez 2013).

Deve-se ainda considerar que na LC, lesões atípicas e de difícil tratamento podem surgir mesmo em indivíduos saudáveis e sem comorbidades (Guimarães et al. 2009).

A resposta imune desenvolvida na leishmaniose está relacionada à capacidade de montar uma reação de hipersensibilidade tardia e de induzir a expansão de clones de linfócitos T antígeno-específicos (Coutinho et al. 1987). Uma exacerbação da imunidade específica pode levar à maior gravidade das manifestações clínicas e isto pode ser devido à persistência do parasito nos tecidos (Carvalho et al. 1985, Oliveira-Camara et al. 2006). A resposta imune *Leishmania*-específica parece ser duradoura, e deve estar envolvida na proteção contra a reativação ou a reinfeção por *Leishmania*, (Da-Cruz et al. 2002, Carvalho et al. 2013, Pereira-Carvalho et al. 2013). Por outro lado, a resposta imune efetora ineficaz ou desregulada pode levar à reativação da doença, como por exemplo, nos casos de AIDS consequente à infecção pelo HIV (Da-Cruz et al. 2000) ou predispor ao aparecimento de formas mucosas (Brodskyn et al. 1999, Tuon et al. 2008).

O diagnóstico da LTA envolve aspectos epidemiológicos, clínico-dermatológicos e laboratoriais (Ministério da Saúde - MS 2010). O diagnóstico laboratorial baseia-se em: reação intradérmica de Montenegro (IDRM), pesquisa de *Leishmania* (pesquisa de amastigotas em esfregaço de tecido ou exame histopatológico e isolamento de promastigotas de *Leishmania* por cultura), detecção de anticorpos séricos anti-*Leishmania* e detecção de DNA parasitário por reação em cadeia da polimerase (PCR). Embora aplicados ao diagnóstico da LTA, nenhum destes métodos é válido para determinar o controle de cura. Apesar dos níveis de imunoglobulinas (Ig) serem considerados baixos na LTA, a técnica de ELISA utilizando-se antígenos de *L. braziliensis* apresentou uma sensibilidade de 60% a 90% para a imunoglobulinas tipo IgG (Gomes-Silva et al. 2008, Fagundes-Silva et al. 2012). Resultados de nosso laboratório mostraram que os títulos de IgG, mais especificamente as subunidades IgG1 e IgG3, diminuem de forma significativa, correlacionando-se negativamente com o tempo de cura clínica até atingir níveis

similares aos observados nos indivíduos controles negativos (Fagundes-Silva et al. 2012). Dessa forma, a dinâmica de produção destas subclasses de Ig parece acompanhar as fases de evolução clínica dos pacientes com LC, podendo ser consideradas como um possível preditor de cura.

Apesar da LC ser uma doença com tendência a evolução benigna, podendo mesmo haver evolução para cura espontânea (Costa 1987), o tratamento medicamentoso é imperioso. Os antimoniais foram empregados pela primeira vez no tratamento da LTA em 1911, por Gaspar Vianna. Os bons resultados obtidos com o tártaro emético [tartarato duplo de potássio e antimônio – $K_2Sb_2(C_4H^2O_6)_2$] foram descritos por este autor no 7ª Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia, em abril de 1912, na cidade de Belo Horizonte. A partir daí, novos estudos foram conduzidos pelos professores Terra e Rabello (D`utra e Silva, 1915).

A forma pentavalente (Sb^{5+}) da medicação (estibugluconato de sódio e antimoniato de meglumina) foi introduzida no tratamento no final da primeira metade do século XX (Berman 1988). Modificações no esquema terapêutico de doses e frequência de aplicações foram introduzidas desde então, até as doses e esquemas atualmente recomendadas (Azeredo-Coutinho et al. 2002, MS 2010).

A dose atual preconizada pelo MS é de 10 a 20 mg Sb^{5+} /kg/dia por 20 dias, nos casos de LC, recomendando-se 15mg Sb^{5+} /kg/dia. Para os casos de LM recomenda-se 20 mg Sb^{5+} /Kg/dia durante 30 dias. A dose máxima diária administrada deve ser de até três ampolas. Independentemente do índice de resistência das diferentes áreas endêmicas brasileiras, o MS indica o mesmo esquema terapêutico para todo o país, o que deveria ser reconsiderado.

Como segunda e terceira opções de tratamento recomendam-se a anfotericina B e a pentamidina.

O desoxicolato de anfotericina B é recomendado por via intravenosa, na dose de 1mg/kg/dia (não ultrapassando-se a dose de 50mg/dia), até uma dose total máxima de 1 a 1,5g para forma LC e de 2,5 a 3g para LM. A anfotericina B lipossomal é aprovada para tratamento da leishmaniose visceral, no entanto, seu uso para tratamento da LC ou LM pode ser feito de maneira *off label*. Quando utilizada, deve ser aplicada na dose de 1 a 4 mg/kg/dia (sem dose máxima diária), até a dose acumulada de 1 a 1,5g para a LC e de 2,5 a 3g na LM.

Quanto ao uso da pentamidina, esta medicação é indicada por via intramuscular profunda, na dose de 1 a 4 mg/kg, aplicada a cada dois dias, até a dose máxima de 2g.

Como observado, poucas são as medicações e esquemas terapêuticos recomendados pelo MS. Revisões sistemáticas sobre o tratamento da LTA indicam a necessidade de novas drogas e mesmo outros esquemas terapêuticos com as drogas já existentes (Santos et al. 2008, Gonzales et al. 2010, Almeida et al. 2008, Olliaro et al. 2013, Reveiz et al. 2013). Outras drogas como a paramomicina são alvo de estudos, no entanto a resposta terapêutica é variada, e não muito satisfatória no tratamento de lesões cutâneas (Faghihi & Tavakili-Kia 2002, Tiuman et al. 2011). Diferentes extratos vegetais são avaliados em múltiplos trabalhos, como citado em Tiuman e cols. (2011), no entanto sua real eficácia ainda necessita de ensaios maiores e mais controlados.

A droga mais promissora para o tratamento da LC é o miltefosine, medicação de uso oral, já tendo recomendação forte pela Organização Panamericana de Saúde, para seu uso em casos de *L. guyanensis* (Chrusciak-Talhari et al. 2011, Reveiz et al. 2013, OPAS 2013). Ela é usada no tratamento da leishmaniose na Índia, no entanto em trabalho realizado na Colômbia, o miltefosine teve eficácia de cura menor que a observada com os Sb^{5+} (Soto et al. 2004). No Brasil, o primeiro estudo avaliando este medicamento foi feito na Bahia, evidenciando eficácia maior que a dos antimoniais em casos de LC daquela região (Machado et al. 2010), onde a resistência aos antimoniais já foi demonstrada (Jirmanus et al. 2012). Apesar da facilidade de ser de uso oral, o miltefosine ainda não é liberado para uso no país, e não é isento de efeitos adversos.

Os antimoniais permanecem assim como primeira opção terapêutica no Brasil e em relação ao risco de reações indesejáveis, os Sb^{5+} podem causar efeitos adversos sérios como manifestações cardíacas, renais e osteoarticulares (MS, 2010), que são na maioria das vezes dose-dependentes (Neves et al. 2010). Apesar dos efeitos adversos mais graves serem relativamente incomuns, podem levar à suspensão do tratamento (Oliveira et al. 2011).

Desde a década de 1990 já foi evidenciado que a utilização do Sb^{5+} em baixas doses é eficaz na cura da doença (Oliveira-Neto et al. 1996). O mesmo autor demonstrou que doses diárias de 5mg Sb^{5+} /Kg/dia, foram tão eficazes quanto doses de 20mg Sb^{5+} /kg/dia (Oliveira-Neto et al. 2000). Também já foi demonstrado que a aplicação de doses intralesionais (IL) de Sb^{5+} podem levar à cura (Oliveira-Neto et al. 1997, Vasconcellos et al. 2012). Da mesma forma, obteve-se êxito de cura clínica com o tratamento alternativo de aplicação de uma ampola da medicação,

independentemente do peso corporal, três vezes por semana até a cura clínica (Oliveira Neto et al. 2006).

Compreender o comportamento clínico, laboratorial e imunológico de pacientes tratados para LTA torna-se de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias de políticas públicas de saúde. Diversos estudos relatam bons resultados com doses baixas de Sb^{5+} de forma isolada, em relatos de casos ou em estudos com grupos pequenos de pacientes. Assim, a investigação da série dos casos que fizeram parte de protocolos de pesquisa com tratamentos alternativos é fundamental para se determinar a eficácia a longo tempo destes esquemas terapêuticos. Esses resultados podem contribuir para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas eficazes com doses mais baixas de Sb^{5+} e, conseqüentemente, menos deletérias e de menores custos.

2 - Justificativa

A leishmaniose cutânea é uma doença infectoparasitária que tem boa resposta clínica ao tratamento medicamentoso específico. Apesar disso, sabemos que há diferenças regionais, sendo o RJ uma área endêmica em que a doença tem uma resposta mais favorável ao tratamento em comparação a outros Estados. Como fator limitante tem-se o fato da droga ser de administração parenteral, e as doses preconizadas pelo MS são também responsáveis por efeitos adversos potencialmente graves, que podem determinar a suspensão da terapia. Em pacientes HIV positivos, que já fazem uso de diversas medicações, além da terapia antirretroviral altamente efetiva (TARV), esses efeitos adversos e interações medicamentosas podem ser ainda mais frequentes.

Apesar do caráter benigno, e mesmo após décadas de conhecimento e estudos sobre a LTA, ainda é bastante discutível o seu controle de cura, que considera apenas o critério clínico, não havendo ainda um parâmetro considerado ideal para esta finalidade, ocorrendo ocasionalmente reativação da doença, mesmo após os pacientes terem sido submetidos a um tratamento completo e serem considerados clinicamente curados.

Alguns estudos (Oliveira-Neto et al. 1996, Oliveira-Neto et al. 1997, Faghihi & Tavakoli-Kia 2003, Vasconcellos et al. 2012) demonstraram que esquemas terapêuticos com doses baixas de antimonial podem levar ao mesmo êxito de cura do que o tratamento preconizado pelo MS. No entanto, ainda é necessário determinar se pacientes tratados com esquemas alternativos apresentam recidivas ou evolução para LM na mesma proporção daqueles que fazem uso de Sb⁵⁺ em doses convencionais.

Um dos fatores que poderiam determinar a real eficácia de tratamentos alternativos seria comparar os pacientes tratados com as doses convencionadas pelo MS com aqueles que utilizaram estes tratamentos.

Estudos com pacientes assintomáticos provenientes de áreas endêmicas de leishmaniose evidenciaram que o perfil de resposta imune celular é semelhante aos pacientes curados há longo tempo (Da-Cruz et al. 2002), com alta proporção de linfócitos TCD4⁺ em relação a TCD8⁺ e níveis elevados de IL-10 nestes indivíduos, que são considerados resistentes à infecção (Bittar et al. 2007). Quando pacientes curados foram comparados com pacientes com doença ativa, foi demonstrado que nos primeiros, os níveis de IL-10 eram mais elevados, e que a relação IFN- γ /IL-10

era mais baixa, próxima a um, evidenciando que a interação entre essas citocinas pode ser de fundamental importância no controle da infecção e manutenção de cura (Gomes-Silva et al. 2007).

A hipótese deste projeto é que esquemas terapêuticos utilizando doses mais baixas de antimonial seriam capazes de induzir a uma resposta clínica de cura a longo prazo (tempo superior a cinco anos) semelhante ao que ocorre com as doses plenas determinadas pelo MS. Pretendemos, desta forma, verificar se doses reduzidas de Sb^{5+} desencadeiam um perfil clínico, parasitológico e imunológico similar aos dos pacientes tratados com doses convencionais de Sb^{5+} .

Esses resultados podem se constituir em um indicativo de que esquemas com doses baixas são eficazes, podendo assim ser considerados como indicação terapêutica da LC para pacientes de áreas endêmicas do RJ, em substituição às doses preconizadas pelo MS.

3 - OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO GERAL

Determinar, através de parâmetros clínicos, parasitológicos e imunológicos, se existe equivalência na eficácia longo tempo após o tratamento da leishmaniose tegumentar com esquemas terapêuticos utilizando-se diferentes dosagens de antimonial pentavalente.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar se a manutenção de cura, a incidência de recidivas e/ou o risco de evolução para forma mucosa a longo prazo são mais elevados em pacientes tratados com doses baixas de antimonial ($5\text{mgSb}^{5+}/\text{kg}/\text{dia}$) em relação ao tratamento convencional ($15\text{mgSb}^{5+}/\text{kg}/\text{dia}$);
2. Avaliar a manutenção de cura longo tempo após o tratamento em pacientes tratados com esquemas de terapia em doses intralesional ou em esquema de tratamento com uma ampola três vezes por semana até a cura clínica;
3. Determinar se o esquema terapêutico em doses mais baixas favorece a persistência parasitária, e se houve relação entre a presença de DNA de *Leishmania* e desfechos de evolução clínica (recidiva e evolução para leishmaniose mucosa).
4. Avaliar se o esquema terapêutico utilizado influencia o perfil de citocinas (tipo Th1, Th2 e Th17) e os níveis séricos dos isotipos de imunoglobulinas que reconhecem antígenos de *Leishmania*.

4 – METODOLOGIA

4.1 – TRABALHOS DE CAMPO E ESTUDOS CLÍNICOS

Essa investigação é um estudo transversal e retrospectivo de pacientes que foram incluídos em protocolos de pesquisa para avaliação do uso de antimonial em esquemas terapêuticos alternativos ou convencionais, tratados até o ano de 2005. Foram selecionados os arquivos médicos de 582 pacientes que fizeram o tratamento para leishmaniose nas instituições de pesquisa participantes no estudo (Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas – IPEC/FIOCRUZ/RJ) e Secretaria de Vigilância em Saúde de Paraty – RJ). Os pacientes foram alocados nos diferentes grupos de acordo com o esquema terapêutico empregado:

- a) dose convencional preconizado pelo MS (15 mg/kg/dia) (n = 135)
- b) doses baixas de antimonial (5mg/kg/dia) (n = 170)
- c) dose diária de uma ampola/dia, 3 vezes por semana até a cura clínica (esquema em dias alternados, 2^a/4^a/6^a) (n = 74)
- d) pacientes que utilizaram tratamento intralesional (n = 203)

4.1.1 - Plano de recrutamento

- a) Levantamento de base de dados dos pacientes atendidos no IPEC/FIOCRUZ a partir de um banco de dados dos pacientes atendidos pelo Dr. Manoel Paes de Oliveira Neto, no período entre 1990 a 2005; e no Posto Municipal de Saúde Derly Elena de Paraty através da busca dos registros de notificação dos pacientes tratados para leishmaniose atendidos pela Dra Alda Maria Da-Cruz e Dra Maria Eugenia Jorge, no período de 1990 a 2000.
- b) Busca ativa de casos através de trabalho de campo, com visitas domiciliares para preenchimento de instrumento de coleta de dados, exame clínico e dermatológico e fotografia das cicatrizes de leishmaniose;
- c) Coleta de material biológico (sangue periférico) durante a visita domiciliar.
- d) Exame das mucosas oral e nasal, por rinoscopia anterior, com o auxílio de espéculo nasal e foco luminoso, a procura de possíveis lesões mucosas, e questionamento aos pacientes sobre sintomas desta afecção durante as visitas domiciliares.

4.1.2 - Investigação clínico-epidemiológica

Levantamento de dados dos prontuários médicos dos pacientes localizados e incluídos no estudo e avaliação clínica durante a visita domiciliar relativos aos seguintes parâmetros:

- a) dados demográficos, clínicos e epidemiológicos durante a doença ativa;
- b) métodos diagnósticos para leishmaniose empregados;
- c) esquema terapêutico utilizado;
- d) exame clínico e dermatológico longo tempo após cura
- e) relatos de recidivas ou queixa de comprometimento de mucosas nasal e/ou oro-faríngea.

4.1.3 - Critérios de inclusão: pacientes registrados como caso de leishmaniose tegumentar e com diagnóstico de leishmaniose comprovado laboratorialmente por pelo menos um dos exames diagnósticos: sorologia, demonstração direta de *Leishmania* (cultura, esfregaço de tecido na impressão em lâmina e exame histopatológico) ou pesquisa de DNA de *Leishmania* por PCR. Ter concluído o tratamento com algum dos esquemas terapêuticos citados há pelo menos cinco anos.

4.1.4 - Critérios de não inclusão: tempo de evolução da doença antes do tratamento inferior a 30 dias, para se excluir pacientes que, devido a pouco tempo de exposição ao parasito não possam ter tido tempo suficiente para desenvolver uma resposta imunológica adequada, ou superior a 180 dias, para se excluir pacientes que possam ter ficado com tempo de exposição ao parasito muito prolongado.

4.1.5- Critérios de exclusão: endereços inexistentes, pacientes que eram desconhecidos no endereço, endereços não localizáveis no mapeamento, pacientes que mudaram de endereço, falecimentos, recusa em participar do estudo, pacientes que residiam em áreas de extremo risco por questões de segurança, indivíduos que não foram encontrados em casa durante a visita no trabalho de campo e pacientes cujos prontuários se perderam, impossibilitando a análise das características clínicas e laboratoriais durante a fase ativa da doença.

4.2 – ESTRATÉGIAS PARA AS AVALIAÇÕES LABORATORIAIS

Para obtenção do material biológico foi coletado um volume aproximado de 30 ml de sangue periférico, em frascos com heparina e EDTA. Os plasmas foram aliquotados e estocados a -20°C .

Do sangue heparinizado foram obtidas células mononucleares (PBMC) utilizadas em ensaios de cultivo *in vitro* para quantificação de citocinas. As PBMC foram isoladas através de gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co, St Louis, CA, EUA) e estimuladas com Concanavalina A (ConA) e com antígenos de *Leishmania*. Os sobrenadantes de cultura foram coletados no 3^o dia para a dosagem de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF, por citometria de fluxo (método CBA – “cytokine binding assay”).

A quantificação de isotipos de imunoglobulinas foi feita através de teste ELISA empregando antígeno solúvel de *Leishmania* para a detecção da classe IgG e suas subclasses. Foram utilizados anticorpos monoclonais para captura (Sigma, EUA) e detecção segundo protocolo estabelecido no nosso laboratório. Os resultados foram mensurados e expressos por densidade ótica (DO).

A detecção de DNA parasitário no sangue foi realizada por PCR convencional.

4.3 - Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelos testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com pos test de Dumm e teste t de Student para comparação entre os grupos e o teste de Spearman para análise de correlação (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). Os resultados foram expressos em média e desvio padrão, mediana e intervalo interquartil. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de $p < 0,05$.

5 – RESULTADOS

5.1 - CASUÍSTICA

Descrição das atividades desenvolvidas nos trabalhos de campo e da distribuição espacial nos pacientes nas áreas endêmicas estudadas

Para o presente estudo, foram incluídos 582 registros de casos elegíveis, após um levantamento de dados junto aos registros de atendimentos ambulatoriais do Dr Manoel Paes Oliveira Neto (IPEC/FIOCRUZ) e dos registros de pacientes que foram tratados para leishmaniose no Posto de Saúde Derly Elena no Município de Paraty, entre os anos de 1990 e 2000.

O mapeamento espacial dos locais de residência dos casos foi realizado através da ferramenta Google Maps[®]. Baseado neste mapeamento estabeleceu-se a dinâmica de busca pelos pacientes, reduzindo-se o número de visitas repetidas a uma mesma área (Figura 2).

Visitas periódicas foram realizadas para as seguintes cidades: Rio de Janeiro (nos bairros de Bangu, Bento Ribeiro, Campo Grande, Guaratiba, Ilha de Guaratiba, Ilha do Governador, Jacarepaguá, Méier, Oswaldo Cruz, Paciência, Padre Miguel, Penha, Piedade, Quintino, Realengo, Senador Camará e Vila Kennedy), Belford Roxo, Duque de Caxias, Itaguaí, Japeri, Mesquita, Niterói, Nilópolis, Nova Iguaçu, Queimados, São Gonçalo, São João de Meriti, Seropédica e Paraty.

As visitas no Município do Rio de Janeiro e região metropolitana foram realizadas entre os meses de agosto de 2010 e dezembro de 2011, e entre fevereiro e setembro de 2013. Na cidade de Paraty o período das viagens compreendeu-se entre fevereiro e dezembro de 2012.

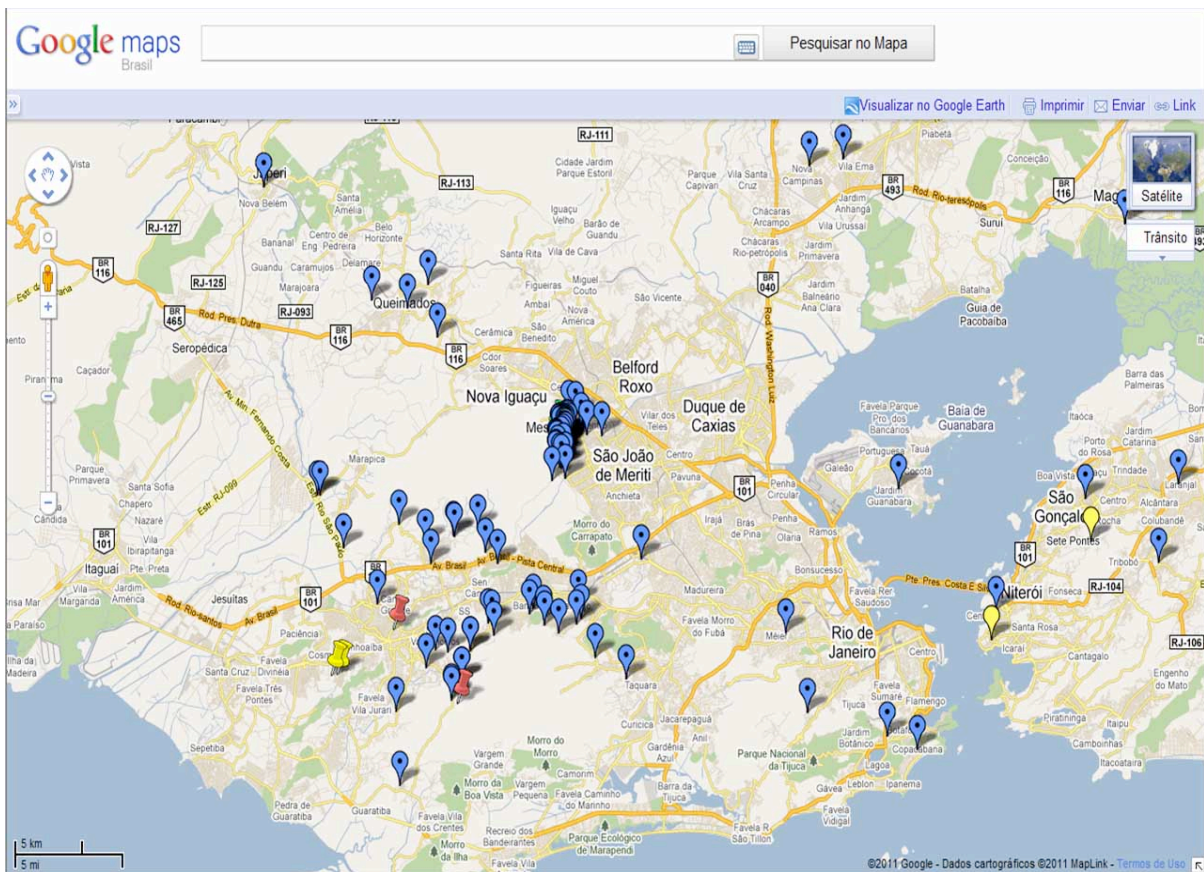


Figura 2: Distribuição espacial de parte dos casos de leishmaniose tegumentar Americana residentes em municípios do Estado do Rio de Janeiro, atendidos no Instituto de Pesquisa Clínicas Evandro Chagas/FIOCRUZ. Cada símbolo azul representa a residência de um caso no mapa. Símbolos amarelos representam casos com dois endereços cadastrados, e em vermelho os casos excluídos do estudo.

Utilizando a ferramenta “Google Earth[®]”, obteve-se também uma visualização espacial, no entanto, localizando os pacientes em relação à cobertura vegetal das áreas endêmicas (Figura 3). À medida que o local de residência dos pacientes era localizado, os casos eram categorizados e os símbolos modificados, caso fossem incluídos (símbolos verdes) ou excluídos (símbolos vermelhos) no estudo (Figura 4).

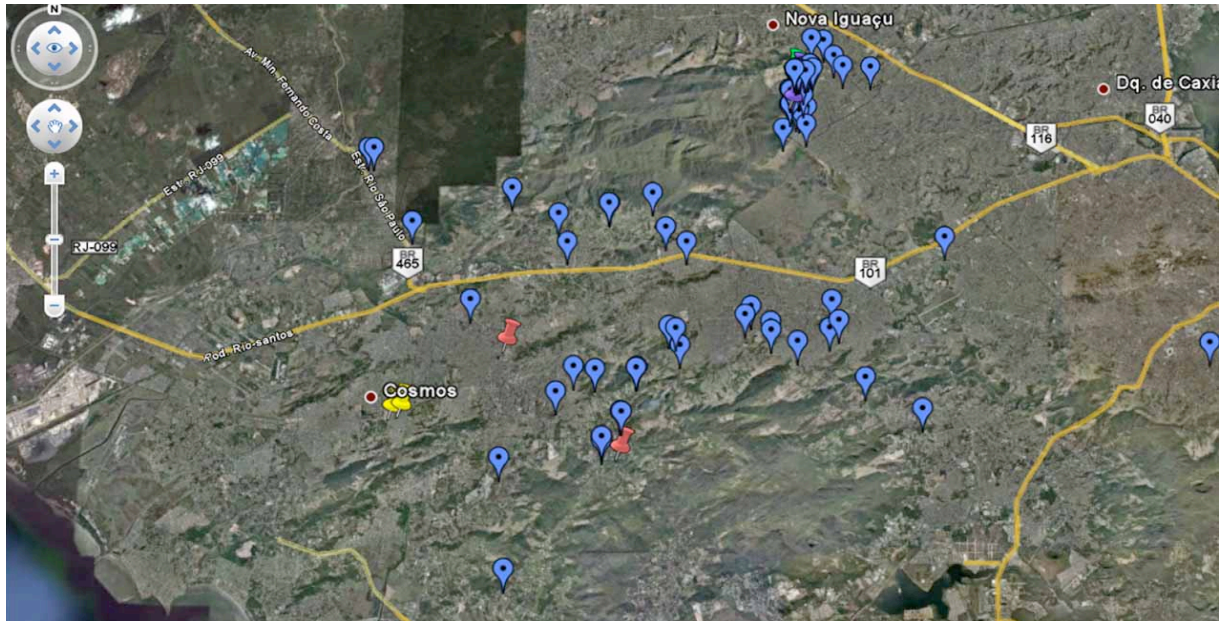


Figura 3: Distribuição espacial de parte dos casos de leishmaniose em relação à cobertura vegetal. Símbolos azuis: residências de casos de leishmaniose ainda não procurados. Símbolos amarelos: casos com dois endereços registrados. Símbolos vermelhos: casos excluídos do estudo.

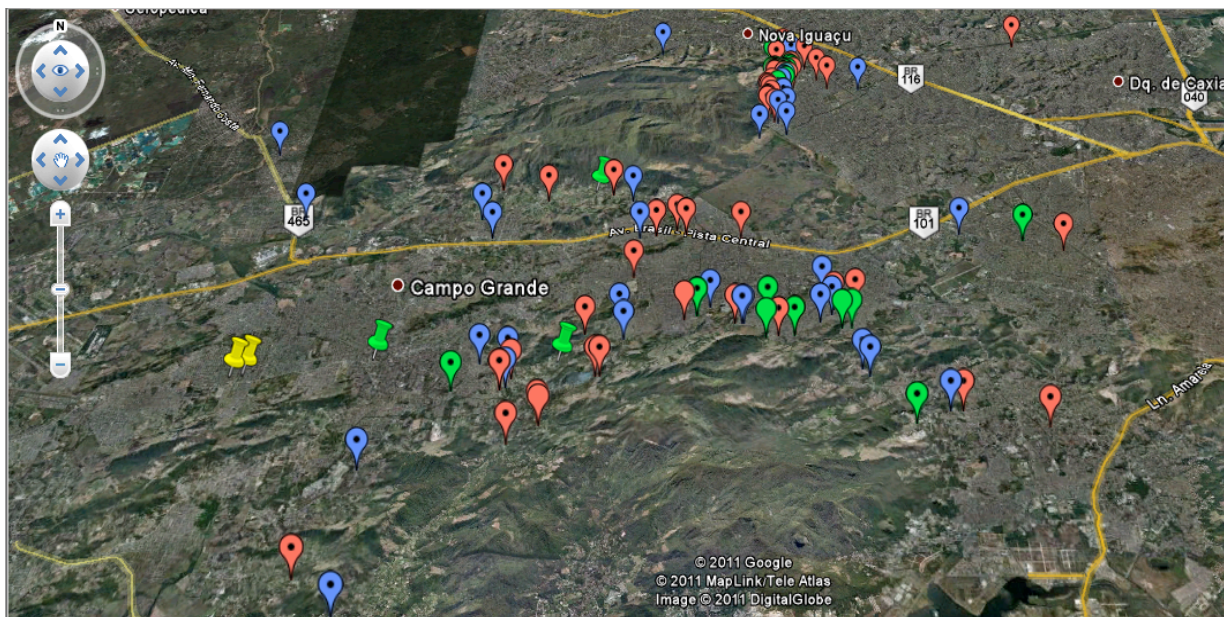


Figura 4: Distribuição espacial de parte dos casos incluídos (símbolos verdes) e excluídos (símbolos vermelhos) do estudo. Símbolos azuis: residências de casos ainda não procurados. Símbolos amarelos: casos com dois endereços registrados.



Figura 6: Aglomerado de parte dos casos na fronteira do maciço montanhoso/cidade, observado no Município de Mesquita. Cada símbolo azul representa o local de residência de um caso. Símbolos verdes: casos incluídos no estudo. Símbolos vermelhos casos excluídos do estudo.

Características semelhantes de distribuição espacial foram encontradas na cidade de Paraty, onde havia o maior número de pacientes tratados com doses convencionais ($15\text{mgSb}^{5+}/\text{kg}/\text{dia}$). Estes pacientes formaram o nosso grupo controle. As representações se encontram nas Figuras 7 e 8. As características de cobertura vegetal nesta cidade, no entanto, não se modificaram muito com o passar dos anos.

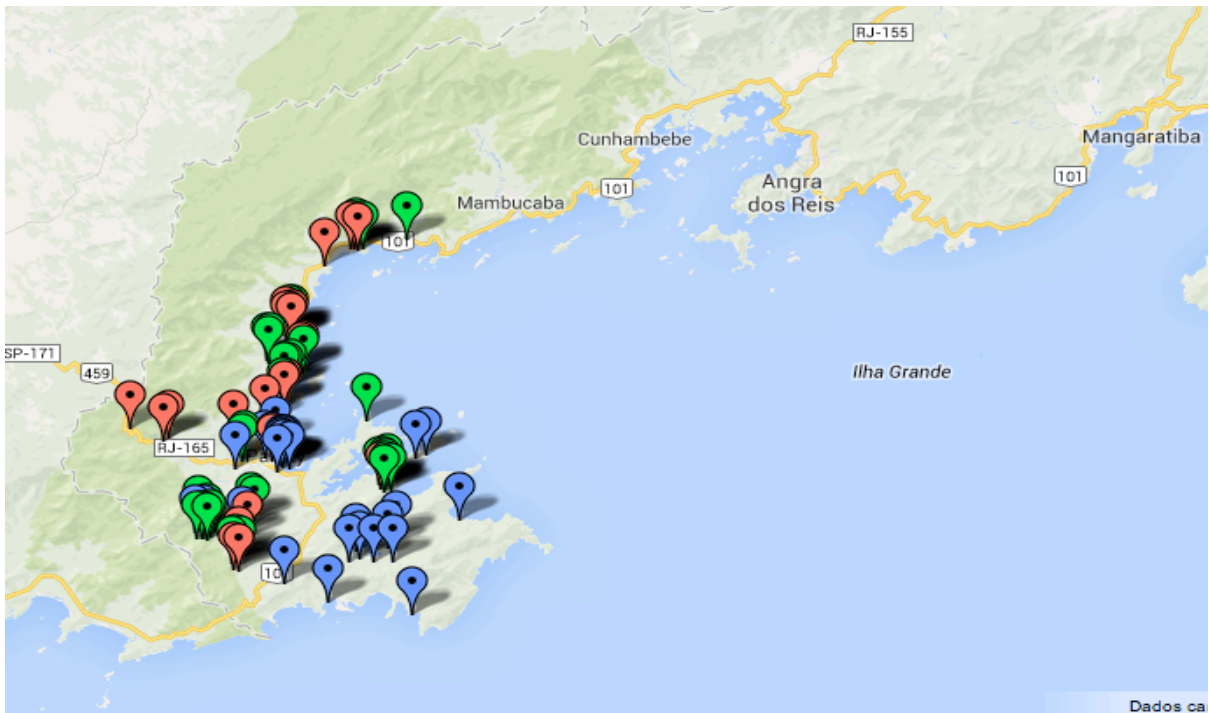


Figura 7: Distribuição espacial dos 135 casos de leishmaniose no Município de Paraty (há sobreposição de símbolos). Símbolos azuis representam as residências de casos ainda não procurados. Símbolos verdes: casos incluídos no estudo. Símbolos vermelhos: casos excluídos do estudo.

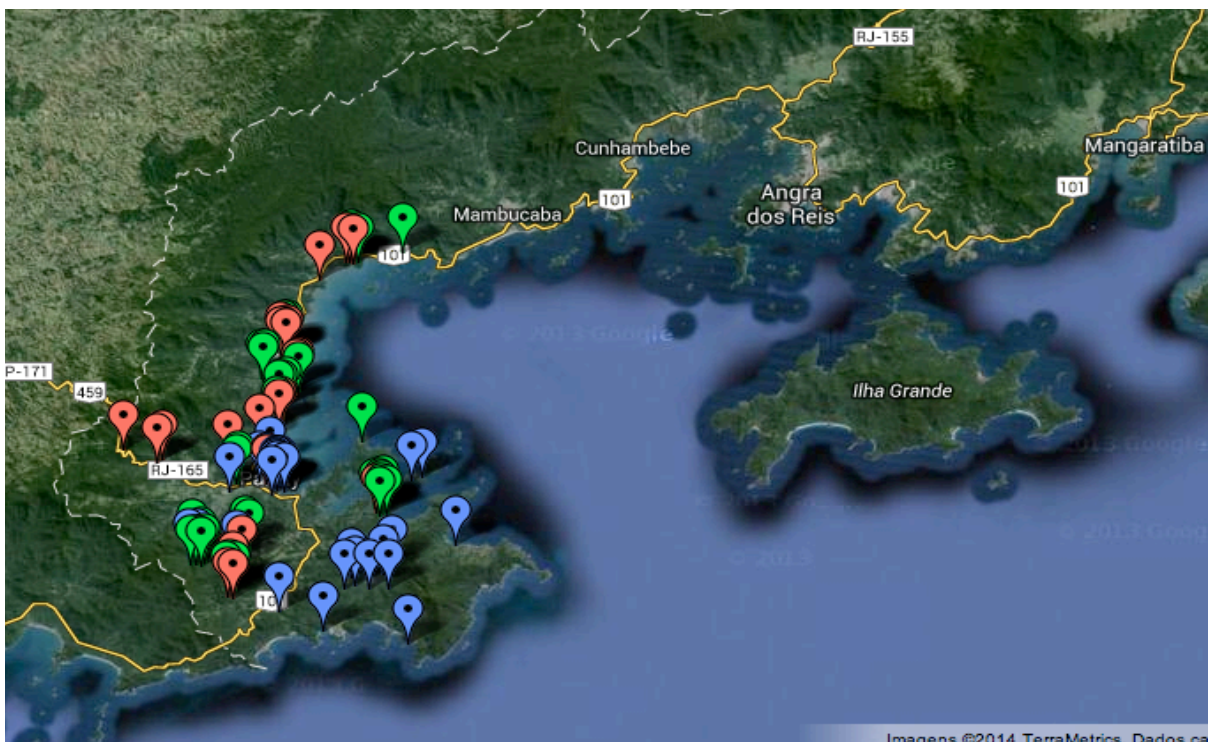


Figura 8: Distribuição espacial dos 135 casos de leishmaniose no Município de Paraty em relação à cobertura vegetal (há sobreposição de símbolos). Símbolos azuis representam as residências dos casos ainda não procurados. Símbolos verdes: casos incluídos no estudo. Símbolos vermelhos: casos excluídos do estudo.

Após serem finalizadas 50 visitas de campo, a imagem final do mapeamento pode ser vista abaixo, na Figura 9.

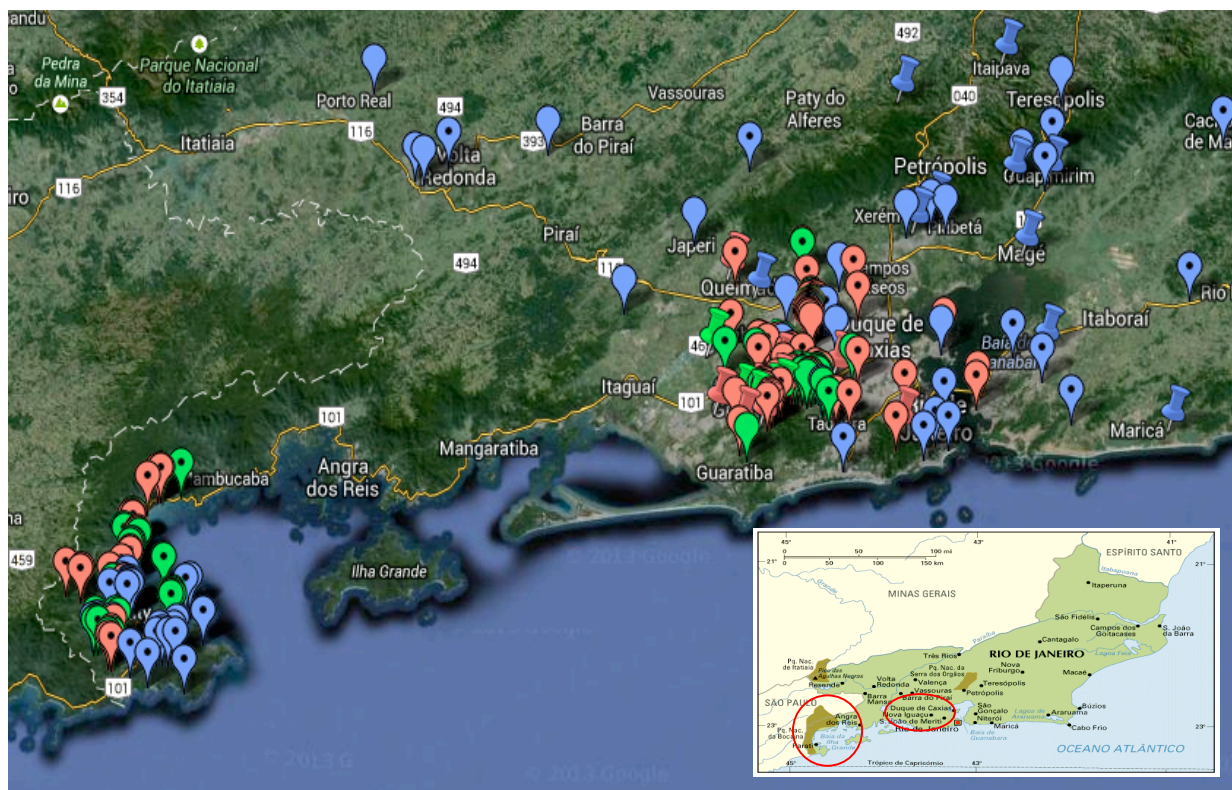


Figura 9: Distribuição espacial final dos 582 casos incluídos e excluídos, nos municípios do Estado do Rio de Janeiro (há sobreposição de símbolos). Símbolos verdes: casos incluídos no estudo; símbolos vermelhos: casos excluídos do estudo; símbolos azuis: casos que não foram procurados. Em menor detalhe, mapa do Estado do Rio de Janeiro, com a localização espacial das duas grandes áreas estudadas, em destaque.

Apesar da distância de cerca de 160 km existente entre as duas regiões analisadas, estudo anterior de nosso grupo destacou que as características clínicas da LTA no Município de Paraty são muito similares às características ecoepidemiológicas e clínicas da LTA encontradas na região metropolitana do Rio de Janeiro (Oliveira-Neto et al. 2000, Vieira-Gonçalves et al. 2008), o que torna estes grupos potencialmente comparáveis.

Do total de 582 pacientes pré selecionados, foram buscados 349 casos, dos quais 100 foram incluídos em nosso estudo, representando um aproveitamento de 28%. Os outros 249 pacientes foram excluídos por diferentes motivos, como observado na Tabela 1. Os demais 233 indivíduos restantes da seleção inicial não

chegaram a ser procurados, por uma questão de distância territorial e difícil logística das solicitações de veículos para trabalho de campo.

Tabela 1: Motivos de exclusão de casos procurados após a visita residencial em trabalho de campo nos municípios do Estado do Rio de Janeiro.

MOTIVO DA EXCLUSÃO	NÚMERO DE PACIENTES
Endereço inexistente	66
Desconhecido no endereço	53
Endereço não localizado no mapa	40
Mudança de endereço	24
Falecimento	21
Recusa em participar do estudo	17
Perda de prontuário	12
Área de risco por questões de segurança	11
Paciente não localizado na residência	5
Total de excluídos	249

Dezessete pacientes se recusaram a participar do estudo, sendo três deles de Paraty e 14 da região metropolitana do Rio de Janeiro. No entanto, o nosso contato direto foi apenas com nove destes. Os oito restantes foram contactados por familiares ou vizinhos, por não se encontrarem na residência no momento da visitação, o que pode ter deturpado a ideia do que realmente tratava a pesquisa.

A receptividade dos pacientes foi considerada muito boa, apesar de estarem curados e terem terminado o tratamento da leishmaniose há muitos anos, por vezes há mais de 20 anos. Após esclarecimento sobre a pesquisa, e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, os que concordaram em participar foram incluídos no estudo.

A maioria dos pacientes, se não todos, relataram terem sido muito bem atendidos pelos médicos e profissionais de saúde da Fiocruz durante a fase ativa da leishmaniose, o que os deixou plenamente satisfeitos com o tratamento.

Acreditamos que este bom atendimento ao paciente no momento da doença ativa colaborou para o bom aproveitamento que tivemos. Este fato deixa claro que o atendimento médico feito com respeito e qualidade é um pilar importante para a realização de futuras pesquisas científicas com pacientes curados.

5.2 - MANUSCRITO I (Submetido) – ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS PACIENTES TRATADOS COM DOSES DE 5mgSb⁵⁺/KG/DIA E OS PACIENTES TRATADOS COM DOSES PLENAS: EFICÁCIA DOS TRATAMENTOS A LONGO PRAZO

Resumo

O tratamento da leishmaniose cutânea (LC) utilizando antimoniais foi iniciado em 1912, no Brasil. O uso da forma pentavalente (Sb⁵⁺) se iniciou na década de 1940, e apesar de ainda ser eficaz para curar a LC, pode causar efeitos adversos graves. Outras opções de tratamento, como pentamidina e anfotericina B, também são de administração parenteral, o que igualmente dificulta o seu uso. Na tentativa de reduzir os efeitos adversos dos Sb⁵⁺, esquemas terapêuticos em doses baixas já evidenciaram ser seguros para LC no Rio de Janeiro (RJ). Apesar das evidências de que doses reduzidas de Sb⁵⁺ levam à cura logo após o tratamento, sua eficácia a longo prazo (mais de cinco anos) não é bem estabelecida. Nosso objetivo foi verificar se a terapia com doses baixas de 5mg Sb⁵⁺/kg/dia por 30 dias (DB) foi tão eficaz quanto o uso de doses regulares de 15mg Sb⁵⁺/kg/dia por 30 dias (DR) na manutenção de cura da LC mesmo longo prazo após o tratamento. Setenta pacientes curados de LC foram analisados e comparados: 37 pacientes (52,8%) no grupo DB e 33 (47,2%) no grupo DR. Os dois grupos eram clinicamente similares durante a fase ativa da LC. Todos os 70 pacientes mantiveram-se curados até o exame dermatológico atual mesmo em períodos tão longos quanto 26 anos após o tratamento com DB. Durante o exame dermatológico atual, não foram detectadas recidivas ou evolução para forma de leishmaniose mucosa (LM). Após um período mínimo de seis anos após o tratamento, a detecção de anticorpos IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* demonstrou níveis similares entre os dois grupos. Os níveis de IgG1 e IgG3 foram negativos em 74,2% e 83,8%, respectivamente, no grupo DB. Não foi observada diferença clínica significativa entre os grupos nos casos em que estes níveis foram positivos. Não foram observadas diferenças entre as citocinas tipo 1 e tipo 2. Entretanto, nas culturas estimuladas com antígenos de *Leishmania* a IL-6 foi significativamente mais elevada do que nas culturas sem estímulo antigênico nos casos DB. Nossos resultados sugerem que o tratamento com DB foi tão eficaz quanto o uso de DR na manutenção de cura da LC, mesmo longo tempo após o tratamento.

Title: Clinical and immunologic evidence that low doses of pentavalent antimonial is effective in maintaining a long-term cure of *Leishmania (Vianna) braziliensis* cutaneous lesions.

Running title: Long-term cure using low-dose antimony therapy

R Vieira-Gonçalves¹, RS Nogueira¹, JF Heringer¹, Mendes-Aguiar CO¹, A Gomes-Silva¹, Santos-Oliveira JR¹, MP Oliveira-Neto^{2*}, AM Da-Cruz^{1*}

Affiliations: ¹Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. ²Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

*Address correspondence to Alda Maria Da-Cruz or Manoel Paes Oliveira-Neto
Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ,
Av. Brasil 4365, Pav. Cardoso Fontes 1º. Andar. Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ,
Brazil. CEP 21040-900. Telephone number: 00.55.21.2562-1039. Electronic mail:
alda@ioc.fiocruz.br, manoel.paes@ipecc.fiocruz.br

Other authors: ricardog@ioc.fiocruz.br, rsantos@ioc.fiocruz.br;
jfheringer@hotmail.com, joannars@ioc.fiocruz.br, gomesas@ioc.fiocruz.br.

Abstract

Antimony therapy was first used to treat cutaneous leishmaniasis (CL) in 1912. Pentavalent antimonial (Sb^{5+}) compounds were introduced as leishmaniasis therapy in the 1940s and are still efficient in curing CL, but they may cause serious adverse effects. Although there are other options for CL treatment, such as pentamidine and amphotericin B, similar to Sb^{5+} , these drugs are also administered parenterally. To reduce the adverse effects of antimony, low-dose therapies were attempted and were proven safe in curing CL in patients in the state of Rio de Janeiro. Despite evidence that low Sb^{5+} doses lead to a clinical cure soon after therapy, the long-term effectiveness (more than five years) of these low dosages is not well-known. Our goal was to determine whether low-dose therapies (LowD; 5 mg/kg/day for 30 days) are as effective as regular doses (RegD; 15 mg/kg/day) for the long-term curative maintenance of CL. The medical records of seventy patients who were successfully treated for CL were retrieved and compared: 37 patients (52.8%) were allocated to the LowD group, and 33 patients (47.2%) to the RegD group. Patients in both groups were clinically similar during active CL disease. Patients in both the LowD and RegD groups remained free of CL for periods as long as 26 years after therapy. During the follow-up clinical examination, neither active lesions nor evolution to mucosal disease was detected. The levels of anti-*Leishmania* IgG1 and IgG3 antibodies, detected after a minimum average time of six years following clinical cure, were similar in both groups. IgG1 and IgG3 titres were negative in 74.2% and 83.8% of patients in the LowD group, respectively. In patients where either IgG1 or IgG3 was positive, no significant differences were observed in the clinical presentations of the patients in the LowD and RegD groups. No differences were observed between the groups regarding the levels of type 1 and type 2 *Leishmania*-induced cytokines. However, in PMBCs from the LowD patients, the IL-6 levels were significantly higher in *Leishmania*-stimulated cultures in the cured patients than in cultures with medium only. Our results show that LowD therapy was as efficient as RegD in the long-term curative maintenance of CL and support the recommendation of its use in areas where the infection has a good response to antimonial compounds.

Key words: Cutaneous leishmaniasis, low dose antimony therapy, long term clinical cure.

Introduction

Leishmaniasis is a complex disease showing significant clinical pleomorphism and epidemiological diversity. It is a parasitic disease caused by protozoans of the genus *Leishmania*. Many species are involved in its pathogenesis, which may explain the varying clinical manifestations (MS, 2010).

According to the World Health Organization (WHO, 2013), the disease is widespread on the American continent, from Mexico to North Argentina. The majority of cutaneous leishmaniasis (CL) cases in South America are found in Brazil, with an incidence of 26,008 cases per year between 2003 and 2007, with an estimated annual incidence of 72,800 to 119,600 (Alvar et al. 2012). Rio de Janeiro State (RJ), located in southeast Brazil, is an endemic area, and *L. (Viannia) braziliensis* is the species associated with CL cases (MS, 2010). In RJ, the municipalities of Rio de Janeiro and Paraty are the major endemic areas, and those infected have been shown to have similar clinical characteristics (Vieira-Gonçalves et al., 2007).

More than a century ago, in 1912, Gaspar Vianna first used antimony therapy to treat CL in Brazil (Dutra & Silva, 1914). Pentavalent antimonial (Sb^{5+}) was introduced as leishmaniasis therapy in the 1940s (Berman, 1988) and is still an efficient cure for CL. Despite its effectiveness in treating CL, patient follow-up is made difficult by the exclusively parenteral administration. Other drugs used as CL therapy, such as pentamidine and amphotericin-B, are also administered parenterally. Miltefosine, an oral medication, has been used in India with good results, mainly for the treatment of visceral leishmaniasis (Dorlo et al. 2012). Miltefosine has only recently been used to treat CL, and few papers discuss its use in clinical practice (Dorlo et al. 2012). Although its efficacy is inconsistent, depending on the species of *Leishmania* involved (Soto et al. 2004), this drug is now recommended for the treatment of *L. guyanensis* infections (Chrusciak-Talhari et al. 2011, Reveiz et al. 2013). The first clinical trial of miltefosine to treat CL caused by *L. braziliensis* in Brazilian patients was published in 2010 (Machado et al. 2010). However, miltefosine has not yet been licensed in Brazil.

Although anti-*Leishmania* drugs are fundamentally safe and severe side effects requiring the discontinuation of treatment are relatively uncommon (Oliveira et al. 2011), a correlation between the concentration of antimony in the body and the incidence of adverse symptoms had been shown (Neves et al. 2009). This correlation

may be more frequent in patients older than 50 years (Diniz et al. 2012). Because the use of antimony compounds may result in serious adverse effects (MS, 2010), the use of experimental low dosages of antimony, including intralesional therapy, has been proposed since the nineties (Oliveira-Neto et al. 1996 and 1997). Although many authors have shown good results using Sb^{5+} at low doses, few papers have been published since then, with most evaluating the patient for an average period of five to ten years after therapy. The cure rates achieved by these studies varied from 80% to 100% (Oliveira-Neto et al. 1997, Uzun et al. 2004, Schubach et al. 2005, Oliveira-Neto & Mattos 2006, Vasconcellos et al. 2012). Despite evidence that low antimonial doses lead to a clinical cure soon after therapy, the long-term efficacy of these low dosages is not well-known.

In the 1980s and 1990s, Brazilian patients were treated with 15 mg Sb^{5+} /kg/day of antimony, administered in three series of 10 days with an interval period of 10 days between each administration, requiring a total of 50 days to complete the therapy. In 1992, the Brazilian Minister of Health published a recommended dosage of 10-20 mg/kg/day for 20 days. Since 1996, this recommendation has been implemented in RJ, although the regimen with interval periods had been shown to be better tolerated (Azeredo-Coutinho et al. 2002). The Sb^{5+} compound remains the most commonly used drug for CL therapy. The dose of 15 mg is effective in curing patients in RJ of CL, although higher dosages are necessary in patients who live in other endemic regions (Machado et al. 2010). Patients may experience serious adverse effects affecting the heart, kidney and osteo-articular junctions, sometimes limiting their ability to work. Despite this therapy, mucosal leishmaniasis (ML) will evolve in an estimated 3 to 5% of patients infected with *L. braziliensis* within five years after therapy (MS, 2010).

The WHO promotes global policies for leishmaniasis control. However, to improve the existing control of the disease, evidence for the effectiveness of different treatment strategies is needed (Reveiz et al. 2013).

Low-dose Sb^{5+} therapies have been proposed since the 1990s due to studies indicating its efficacy (Oliveira-Neto et al. 1997, Schubach et al. 2005, Oliveira-Neto & Mattos, 2006, Vasconcellos et al. 2012), even for mucosal disease (Oliveira-Neto et al. 2000). Low-dose antimony compounds may mean a lower incidence of adverse effects and lower costs. However, these low-dose therapeutic regimens are not yet

recommended, which is due, in part, to the absence of long-term data regarding the relapse or progression to ML more than 5 years after completing low-dose therapy. Our goal was to show whether low-dose therapies are as effective as regular doses in maintaining a long-term cure of CL.

Methodology

Study population

After a review of medical records for clinical and epidemiologic data, patients with CL who were treated with a low dose of antimony (LowD, 5 mg Sb⁵⁺/kg/day/30 days) or a regular dose (RegD, 15 mgSb⁵⁺/kg/day/30 days) and who had completed treatment at least five years ago were selected from two RJ state municipalities: Rio de Janeiro and Paraty cities. A total of 305 individuals were enrolled in the study and divided into two groups. The LowD group was composed of 170 patients, and the RegD group was composed of 135 patients. Field researchers sought 224 of these selected patients and, in 50 field visits, performed interviews and dermatologic examinations of these patients in their houses.

These previous patients were questioned and examined for signs or symptoms of mucosal disease (nasal discharge, bleeding, pain, ulcerations or other mucosal abnormalities). Examinations for scars or skin lesions compatible with CL were performed. Blood samples for future immunoassays were collected, and serum aliquots were stored at -20°C.

ELISA assay for detecting anti-Leishmania spp. antibodies – IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4

The immunoassay protocol was performed as previously described (Fagundes-Silva et al. 2012). Briefly, soluble antigens of *L. braziliensis* promastigotes (MHOMBR/195/2903) (10 µg in each 200-µL well) were added to polystyrene flat-bottom microtitre plates (Nunc-immuno Plate, Roskilde, Denmark) and incubated at 4°C overnight in a humidified chamber. The plates were washed, and diluted sera (1:40) were added and incubated at room temperature. After six washes, the plates were incubated with peroxidase-conjugated mouse monoclonal anti-human IgG1 and IgG3 (catalogue number HP6047, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA,

USA). After further washes, the enzymatic reaction was developed, and the colour evolution was terminated with a stop solution. The absorbance was measured with an EMax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 492 nm. The results were expressed as optical density (OD).

Detection of Leishmania DNA by polymerase chain reactions (PCR)

To isolate DNA from 300 µL of peripheral blood, the Blood GenomicPrep Mini Spin Kit for DNA (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) was used in accordance with the manufacturer's instructions. PCR was performed according to previously described procedures (Pirmez et al. 1999). The following primers were used: HM1 [5'-(CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC)-3], HM2 [5'-(GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA)-3'] and HM3 [5'-(GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC)-3] (Gibco, São Paulo, SP). PCR was performed in a total reaction volume of 25 µL under the following conditions: 35 cycles of 30 s each consisting of denaturation at 94°C, annealing at 54°C and extension at 72°C. A GENEAMP PCR System 9700 automatic thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used. Amplified products (10 µL) were analysed by electrophoresis in 1% agarose gels stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL) and visualised with UV.

Cytokine measurements

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) density centrifugation and used for *in vitro* stimulation with concanavalin A (20 µg/mL) and *L. braziliensis* antigens (LbAg, 1 mg/mL). After 3 days, the cell culture supernatants were harvested and stored at -20°C until use. Cytokine levels were measured by a Cytometric Beads Array kit (CBA, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and processed according to the manufacturer's protocol. The following cytokines were quantified: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF and IFN-γ. The data were acquired using a FACSCalibur system and were analysed using the software provided by the manufacturer (FCAP Array, BD Biosciences). The standard curve for each cytokine covers a range of 20 to 5,000 pg/mL.

Statistical analyses

The ELISA cut-off values were determined using receiver operating characteristic curves (ROC). The Mann-Whitney, Student t test and Kruskal–Wallis ANOVA test followed by Dunn’s multiple comparisons post test were used to compare the groups. Spearman’s test was used to perform the correlation between different parameters. The software GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was employed. The results were expressed as the mean \pm standard deviation or as the median and interquartile interval. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant.

Results

Case series

Seventy out of 224 (31.2%) cured patients with a history of CL were located: 37 patients (52.8%) in the LowD group, and 33 patients (47.2%) in the RegD group. The other 154 individuals who qualified for the study were not enrolled for various reasons: change of address (36.5%), no address (29.5%), death (9.5%), patient refusal to participate (9.5%) and other causes (15%).

Clinical evaluation during active cutaneous leishmaniasis disease

Patients in both groups presented with similar clinical features during active CL disease. The duration of illness prior to diagnosis varied from 2 to 3 months in both groups. The male/female ratio was 12/25 in the LowD group and 11/22 in the RegD group. The mean age (\pm SD) was 31.5 ± 18.5 years in the LowD group and 26.5 ± 16.5 years old in the RegD group. The median number of lesions was 1.7 (LowD) and 1.4 (RegD) lesions per patient. All patients had ulcerated lesions, with an average area of 6.7 ± 6.0 cm² (LowD) and 2.7 ± 2.9 cm² (RegD). In the LowD and RegD groups, the limbs (legs and arms) were affected in 65% and 70%, respectively, and the face was affected in 21% and 24%, respectively.

Importantly, ML was absent in all patients during active CL disease.

Laboratory diagnosis of active cutaneous leishmaniasis disease

The diagnosis of leishmaniasis during the active phase of the disease was confirmed by parasitological diagnosis (imprint, histopathology, culture or protein chain reaction) in 22/25 LowD patients and in 10/13 RegD patients. The Montenegro Skin Test was positive in both groups (median 22, range from 17 to 30 mm in the LowD group; median 15, range from 10 to 15.3 mm in the RegD group).

Therapeutic regimen

The LowD group was treated with a 5 mg dose of Sb^{5+} /kg/day for 30 days. The RegD group was treated with a dose of 15 mg Sb^{5+} /kg/day for 30 days (3 series of 10 days, with an interval period of 10 days between each series). The average antimonial accumulated dose per patient was 8,574 mg in the LowD group and 22,041 mg in the RegD group (a 2.57-fold greater amount).

Clinical response soon after low and regular doses of antimonial

In the LowD group, 86.5% (32/37) of the patients were cured at the end of the treatment. Two patients (5.4%) required two further rounds of the LowD therapeutic schema to be successfully treated, and three patients (8.1%) required a complementary regular dose to be cured. No sequelae were noted, and no resistance to a higher Sb^{5+} dose was observed immediately after therapy. Only one patient (2.7%) relapsed one year after the second dose (regular dose therapy) and was successfully treated with amphotericin B (575 mg). One cured patient (2.7%) developed ML one year after treatment and was successfully treated with 20 mg Sb^{5+} /kg/day for 21 days plus an amphotericin B (1,462.5 mg) regimen.

In the RegD group, 32/33 patients (97%) were successfully treated, with only one patient (3%) requiring a second round of the same therapy. Four patients (12.1%) had relapses one to four years after the treatment and were successfully treated after another regular Sb^{5+} regimen. One patient (3%) developed ML three years after treatment and was cured after a 30-day course of 15 mg Sb^{5+} /kg/day.

No significant differences were observed between the LowD and RegD groups in terms of the number of lesions, the time of disease evolution prior to diagnosis and the size and location of the lesions.

Long term follow-up after therapy

The average time of the follow-up examination after treatment was 14 years in the LowD group (ranging from 11 to 26 years) and 18 years in the RegD group (ranging from 6 to 27 years). No relapses or ML was detected in the long-term CL follow-up of either group.

All leishmaniasis scars remained free of active disease in the LowD and RegD groups. Active lesions of leishmaniasis and cutaneous scars are shown in Figure

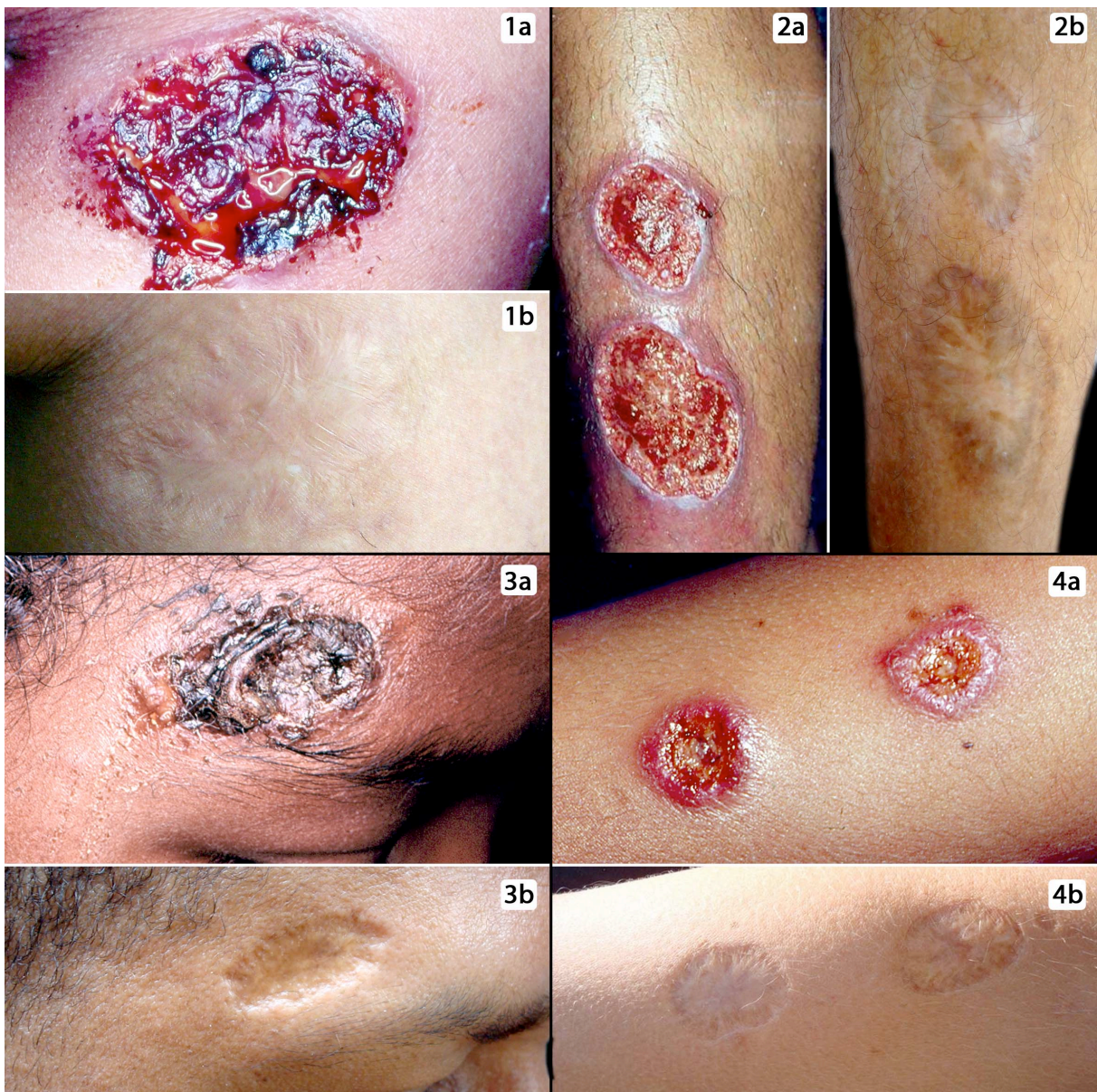


Figure 1: Lesions of patients with active cutaneous leishmaniasis before treatment (1a, 2a, 3a and 4a), and the maintenance of a long-term cure after low-dose antimony therapy (5 mg Sb⁵⁺/kg/day/30 days) in these same patients. 1b and 3b: 24 years after therapy, 2b: 13 years after therapy; 4b: 14 years after therapy.

Detection of IgG1 and IgG3 anti-Leishmania >5 years after therapy

Blood samples from 31 patients from the LowD group and 21 patients from the RegD group were collected for IgG isotype quantification. After a minimum average of six years after the clinical cure, similar levels of the IgG1 and IgG3 anti-*Leishmania* antibodies were found. In the LowD group, the IgG1 and IgG3 titres were negative in 74.2% and 83.8%, respectively. In the RegD group, similar results were found, with 85.8% and 71.5%, respectively, of samples having negative titres (i.e., lower than the cut-off value). No significant differences were observed for the positive titres between the LowD and RegD groups for either IgG1 or IgG3. The results of the IgG quantification by isotype are shown in table 1.

Table 1: Frequency of negative titres of anti-*Leishmania braziliensis* immunoglobulin G and IgG isotypes in individuals with a clinical cure of cutaneous leishmaniasis who were evaluated years after the treatment with low or regular doses of pentavalent antimony.

Therapeutic Regimen	Cases presenting negative anti- <i>Leishmania</i> immunoglobulin				
	IgG	IgG 1	IgG 2	IgG 3	IgG 4
LowD (n = 31)	54.8%	74.2%	83.8%	83.8%	96.8%
RegD (n = 21)	66.7%	85.8%	90.5%	71.5%	95.2%

Antimonial pentavalent regimes: low dose (LowD) = 5 mg Sb⁵⁺/kg/day/30 days; regular dose (RegD) = 15 mg Sb⁵⁺/kg/day/30 days (3 series of 10 days, with an interval period of 10 days between each series).

DNA detection of Leishmania spp. by polymerase chain reaction assay.

PCR reactions were performed using DNA from the blood samples of 31/37 LowD patients and 23/33 RegD patients. Positive reactions were observed in 5/23 RegD patients (21.8%). The reaction was negative in all LowD patient samples (Table 2).

Table 2: Evaluation of parasite persistence by detecting *Leishmania spp.* DNA in blood samples from patients cured of cutaneous leishmaniasis years after therapy

Therapeutic Regime	<i>Leishmania</i> DNA detection by PCR (n)	
	Positive	Negative
LowD (n = 31)	0	31
RegD (n = 23)	5	18

Antimonial pentavalent regimes: low dose (LowD) = 5 mg Sb⁵⁺/kg/day/30 days; regular dose (RegD) = 15 mg Sb⁵⁺/kg/day/30 days (3 series of 10 days, with an interval period of 10 days between each series)

The cytokine levels of 14 patients who received LowD therapy and 22 who received RegD therapy were assessed in cell culture supernatants harvested from PBMCs stimulated with Lb-Ag antigen, concanavalin A (ConA) or medium only. Similar levels of IL-4, IL-10, IL-17, IFN- γ and TNF were observed in all patients, regardless of therapeutic regimen (Figure 1 and Table 3). However, the LowD group displayed higher median levels of IL-6 compared with the RegD group. Interestingly, high levels of IL-6 were spontaneously secreted by cells incubated in medium only, although a significant difference in IL-6 secretion was only observed between unstimulated cells and cells stimulated with Lb-Ag from the LowD group.

There was a tendency for PBMCs from the LowD group to secrete higher IFN- γ levels compared with PBMCs from the RegD group (Figure 2). Curiously, there was a positive correlation between IFN- γ and TNF production and IgG1 levels only in the LowD group. Only two patients from the LowD group secreted high levels of IL-17A, but no clinical relevance was associated with this finding.

The PBMCs from both groups of patients secreted elevated levels of all the cytokines in response to Con-A compared with PBMCs incubated in medium only ($p < 0.05$). This finding was observed even for IL-4, which was negative in the LbAg-stimulated cultures. Nevertheless, the cytokine production in response to ConA was not significantly different between the LowD and RegD groups (Table 3).

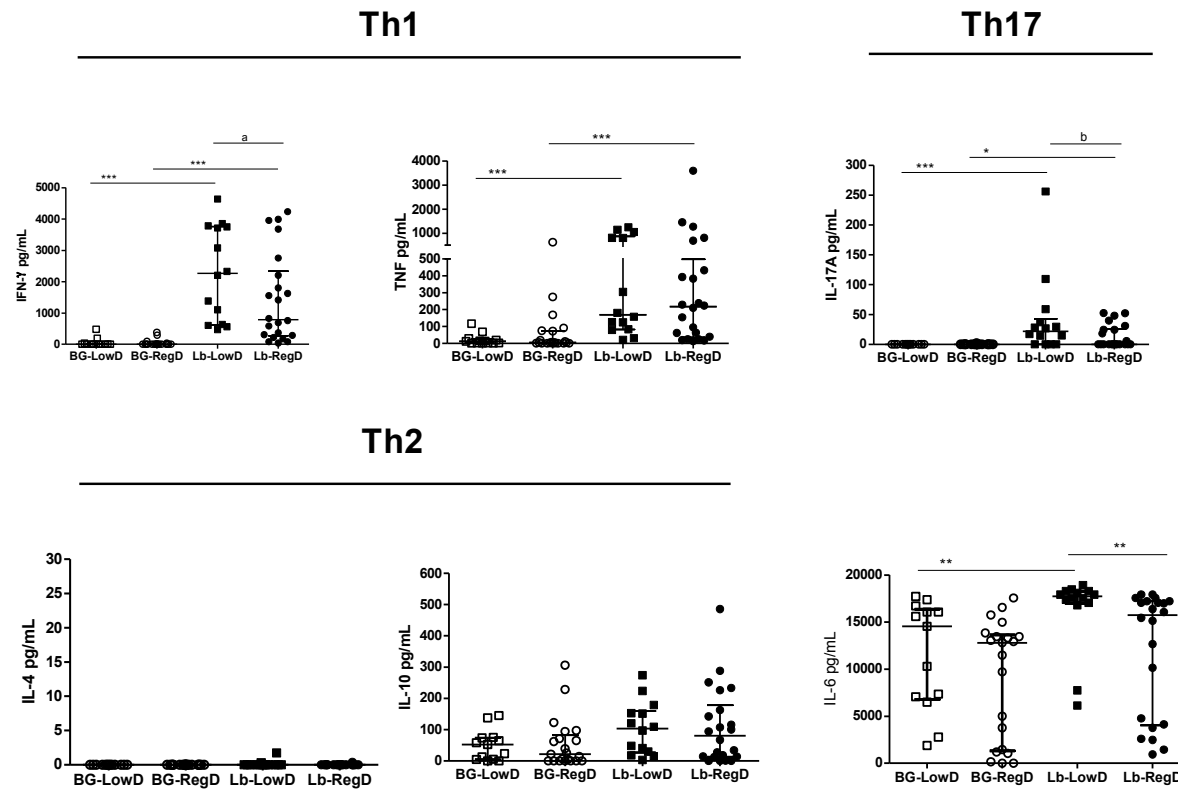


Figure 2: *Leishmania braziliensis* antigen-induced cytokine production in leishmaniasis patients in the long term after therapy. Patients were treated with low doses (LowD; 5 mg Sb⁵⁺/kg/day/30 days) or regular doses (RegD; 15 mg Sb⁵⁺/kg/day/30 days in 3 series of 10 days, with an interval period of 10 days between each series). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of cutaneous leishmaniasis patients were cultured with a crude extract of *L. braziliensis* antigen (Lb) or with medium only (Background-BG), and the supernatants were collected after 72 h for cytokine quantification. (A) IFN- γ and TNF levels from the Th1 profile. (B) IL-17 levels from the Th17 profile. (C) IL-4 and IL-10 from the Th2 profile. (D) IL-6 levels from the inflammatory profile. The results are shown for each sample (pg/mL). Each point represents one subject. Horizontal bars indicate the median value of each group. BG-LowD – open squares. BG-RegD – open circles. Lb-LowD – solid squares and Lb-RegD – solid circles. * Kruskal-Wallis test: p < 0.05. ** p < 0.01 and *** p < 0.001. Obs: a (p=0.08) indicates a significant difference between the Lb-LowD and RegD group based on the Mann-Whitney test.

Table 3. *Leishmania braziliensis* induced-cytokine levels in the culture supernatants of peripheral blood mononuclear cells from cutaneous leishmaniasis patients evaluated years after the treatment with low or regular doses of pentavalent antimony.

<i>In vitro</i> cultures of peripheral blood mononuclear cells							
Cytokines	Medium		Concanavalin A		<i>Leishmania</i> antigen		<i>P</i> value
pg/mL	LowD (n=14)	RegD (n=22)	LowD (n=14)	RegD (n=22)	LowD (n=14)	RegD (n=22)	*
IL-4	0.0	0.0	3.6 [2.6-26.9]	24.3 [9.5-80]	0.0 [0.0-1.7]	0.0 [0.0-0.3]	NS
IL-6	14,544 [6,772-16,382]	12,791 [1,332-13,641]	18,450 [17,513-19,056]	17,909 [13,438-18,634]	17,733 [16,980-18,268]	15,746 [4,027-17,212]	0.002[#]
IL-10	52.9 [4.9-74.4]	21.6 [0.0-82.7]	587.3 [473-896]	349.7 [310-708]	103.3 [26.8-159]	80.9 (13.2-179)	NS
IL-17A	0.0	0.0	1,756 [1,153-3,108]	1,449 [972-2,253]	21.9 [0.0-42.6]	0.0 [0.0-26]	0.09 [‡]
IFN- γ	1.2 [0.0-20.2]	0.0 [0.0-0.9]	3,800 [2,990-4,011]	3,677 [3,286-3,854]	2,266 [622,7-3,755]	789.8 [268.6-2,340]	0.08 [‡]
TNF	12.5 [1.7-24]	4.7 [0.0-73.8]	1,302 [747.1-2,046]	1,195 [838.8-2,260]	169.2 [82.6-874]	217.5 (35.4-499)	NS

Antimonial pentavalent schedule: low dose (LowD) = 5 mg Sb⁵⁺/kg/day/30 days; regular dose (RegD) = 15 mg Sb⁵⁺/kg/day/30 days (3 series of 10 days, with an interval period of 10 days between each series). n, number of patients; IL, interleukin; IFN- γ , interferon gamma; TNF, tumour necrosis factor; NS, not significant. Note: [interquartile range] values. *Among LowD patients and RegD patients. [‡] P value based on Mann-Whitney U test. [#] P related to *Leishmania* antigen dosages.

Discussion

Leishmaniasis is considered a neglected disease, and research into CL therapy has not progressed compared with studies of other non-neglected diseases (Yamey & Torreele 2002). Although studies on the treatment of leishmaniasis are needed, new drug research is expensive, and budgetary considerations are daunting. Nevertheless, studies involving new therapeutic strategies or comparing the efficacy of existing drugs are needed (Reveiz et al. 2013), and these studies should consider extended follow-up periods (Gonzalez et al. 2010).

In this study, groups of patients treated with low and regular antimony doses showed no clinical differences during the active CL disease phase. In this study, we demonstrated that patients treated with a low or regular dose of Sb⁵⁺ presented similar long-term clinical outcomes, even six to 27 years after therapy. Indeed, the long-term IgG1 and IgG3 anti-*Leishmania* titres and cytokine production profiles were similar in both groups.

Although there were more women than men in this study, this bias does not indicate a higher CL frequency in women. This observation could be explained by the changing epidemiology of the disease, once present only in forested areas and now present in peridomiciliar areas. Furthermore, in Brazil, the social and economic characteristics are such that a more marked female presence in or around houses is not surprising.

Patients treated with the LowD regimen reached an excellent cure rate of 86.5% soon after treatment and of 100% in the long term. Interestingly, even the presence of LowD patients with a higher average lesions area than the RegD patients did not affect the effectiveness of the therapy. One ML case was detected in the LowD group, but ML also occurred in the RegD group. An estimated 3-5% of all CL evolves to ML (MS. 2010), and some studies in Brazil have shown an incidence ranging from 2.7% to 9.2% (Oliveira-Neto et al. 2000. Jirmanus et al. 2012). When the two groups were evaluated a minimum of 6 years after therapy, no relapses or evolution to ML was detected, even after 25 years.

The IgG1 and IgG3 levels in both the LowD and RegD groups were similar. The immunoglobulin levels tended to decrease with time, although some patients may maintain

antibodies against *Leishmania* antigens (Fagundes-Silva et al. 2012). Some patients in the LowD and RegD groups remained positive for IgG1 (25.8% and 14.2%, respectively) and IgG3 (16.2% and 28.5%, respectively) even many years after therapy. No significant clinical correlation was observed, and there was no statistical correlation with PCR positivity. The reason for the maintained immunoglobulin positivity remains unclear.

Type 1 (IL-2, IFN- γ and IL-2) and type 2 (IL-4 and IL-10) cytokine levels were similar between the LowD and RegD groups, which may indicate that different dosages of Sb⁵⁺ in CL treatment do not interfere with the immune response associated with a clinical cure. IL-6 production was higher in the patients who received the LowD regimen. There may have been an extended exposure to *Leishmania* antigens in the LowD patients compared with the RegD patients, leading to a greater antigenic stimulation in the LowD patients. Although the IL-6 function is related to its pro-inflammatory action (Rose-John et al. 2012), the mechanisms of IL-6 induction can also lead to IL-10-producing Tr1 cells, which control auto-immune diseases (Jin et al. 2013). High levels of IL-6 were implicated in the down-regulation of pro-inflammatory responses in leishmaniasis and could be implicated in the low risk of ML progression (Castelucci et al. 2006). After determining that LowD therapy leads to long-term clinical cures, the role of Sb⁵⁺ therapy in the anti-*Leishmania* immune response needs to be elucidated.

The genotypic differences among *Leishmania* species in different regions of Brazil have been demonstrated (Falqueto et al. 2003. Cupolillo et al. 2003), and these differences most likely influence the response to antimony therapy and the immune response of patients. Consequently, we suggest that low-dose therapy studies be considered for other endemic areas of Brazil.

The average accumulated dose of antimony in the LowD group was 2.57 times lower than that in the RegD group. This lower amount most likely means a lower risk for developing common adverse side-effects to antimony. Another important point is that the use of a low dose has a great impact on the cost of treatment. In this group, a mean savings of € 48 per patient was estimated to be obtained by using a dose that is 2.57 times lower than currently prescribed.

More studies on leishmaniasis that include leishmaniasis therapy are needed, including

research comparing low-dose therapeutic regimens. Our results indicate that low-dose therapy is effective over the long term, and this regimen may be recommended in the future to treat patients with CL in RJ.

Financial support: This work was funded by IOC/FIOCRUZ internal funds, by PAPESV/VPPDT/FIOCRUZ and by FAPERJ APQ-1 (grant number E-26/170-844/2003), CNPq Edital Universal. RV-G was a PhD student, and JRS-O is postdoctoral fellow sponsored by CNPq. AG-S is a researcher sponsored by CNPq/VPPLR-FIOCRUZ (Research Visitor Program). AMD-C is a CNPq and FAPERJ (CNE) research fellow.

Conflict of interest: The authors declare they have no conflicts of interest in this study.

Acknowledgements: We are grateful to Dr. AH Pons and CM Cascabulho from Plataforma de Citometria de Fluxo from IOC/FIOCRUZ and to Ms. R Batista for the PCR reactions. We also thank all of the patient volunteers.

References

- Alvar J. Ve Les ID. Bern C et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One* 2012; 7: e35671. 1-12.
- Azeredo-Coutinho RB. Mendonça SCF. An intermittent schedule is better than continuous regimen of antimonial therapy for cutaneous leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro. Brazil. *Rev Soc Bras Med Tropical* 2002; 35: 477-481.
- Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms. clinical efficacy and future strategies. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 560-586.
- Castellucci L. Menezes E. Oliveira J et al. IL-6 – 174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Diseases* 2006; 194: 519-527.
- Chrusciak-Talhari A. Dietz R. Chrusciak-Talhari C et al. 2011. Randomized controlled clinical Trial to Access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guayanensis* in Manaus. Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84: 255-260.
- Cupolillo E. Brahim LR. Toaldo CB et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microb* 2003; 41: 3126-3132.
- Diniz DS. Costa ASV. Escalda PMF. The effect of age on the frequency of adverse reactions caused by antimony in the treatment of American tegumentary leishmaniasis in Governador Valadares. State of Minas Gerais. Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45: 597-600.
- Dorlo TPC. Balasegaram M. Beijnen JH et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2576-2597.
- D'utra & Silva. O. Leishmaniose. *Bol Soc Bras Dermatol* 1914; 3: 39-40.
- Fagundes-Silva GA. Vieira-Gonçalves R. Nepomuceno MP et al. Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunol* 2012; 34: 486-491.

- Falqueto A. Sessa PA. Ferreira AL et al. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 1003-1010.
- González U. Pinart M. Reveiz L et al. Designing and reporting clinical trials on treatments for cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 409-419.
- Jin JO. Han X. Yu Q. Interleukin-6 induces the generation of IL-10-producing Tr1 cells and suppresses autoimmune tissue inflammation. *J Autoimmun* 2013; 1: 1-27.
- Jirmanus L. Glesby MJ. Guimarães LH et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86: 426-433.
- Machado PR. Ampuero J. Guimarães LH et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *Plos Negl Trop Dis* 2010; 4: e912.
- MS – Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana 2010. accessed in December 2013
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf
- Neves DBJ. Caldas ED. Sampaio RNR. Antimony in plasma and skin of patients with cutaneous leishmaniasis – relationship with side effects after treatment with meglumine antimoniate. *Trop Med Inter Health* 2009; 14: 1515-1522.
- Oliveira LF. Schubach AO. Martins MM et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Act Trop* 2011; 118: 87-96.
- Oliveira-Neto MP. Schubach A. Araújo ML et al. High and low doses of antimony (Sb^v) in American cutaneous leishmaniasis. A five years follow-up study of 15 patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91: 207-209.
- Oliveira-Neto MP. Schubach A. Mattos M et al. Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil - an area of *Leishmania (V.) braziliensis* transmission. *Int J Dermatol* 1997; 36:463-468.

- Oliveira-Neto MP. Mattos MS. Pirmez C et al. Mucosal leishmaniasis (“espundia”) responsive to low dose of N-metil Glucamine (Glucantime^R) in Rio de Janeiro. Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2000; 42: 31-25.
- Oliveira-Neto MP. Mattos MS. Perez MA et al. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State. Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Intern J Dermatol* 2000; 39: 506-514.
- Oliveira-Neto MP. Mattos MS. An alternative antimonial schedule to be used in cutaneous leishmaniasis when high doses of antimony are undesirable. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39: 323-326.
- Pirmez. C. Trajano. VS. Oliveira-Neto. MP 1999. Use of polimerase chain reaction in the diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro. Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1819- 1823.
- Revez L. Maia-Elkhouury AN. Nicholls RS et al. Interventions for American cutaneous and muococutaneous leishmaniasis: a systematic review update. *Plos One* 2013; 8: e61843. doi: 10.1371/journal.pone.0061843
- Schubach AO. Marzochi KBF. Moreira JS et al. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Rev Soc Bras Trop* 2005; 38: 213-217.
- Soto J. Arana BA. Toledo J et al. Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Diseases* 2004; 38: 1266-1272.
- Uzun S. Durdu M. Culha G et al. Clinical features. epidemiology and efficacy and safety of intralesional antimony treatment of cutaneous leishmaniasis: recent experience in Turkey. *J Parasitol* 2004; 90: 853-859.
- Vasconcellos ECF. Schubach AO. Valete-Rosalindo CM et al. American tegumentary leishmaniasis in older adults: 44 cases treated with an intermittent low-dose antimonial schedule in Rio de Janeiro. Brazil. *J Am Geriatr Soc* 2010; 58: 614-616.
- Yamey G. Torreele E. The world’s most neglected diseases. *Br Med J* 2002; 325:176-177.c
- WHO – World Health Organization acceded in July 2013.
http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html

5.3 - MANUSCRITO II (EM PREPARAÇÃO) – ESTUDO DOS PACIENTES TRATADOS COM DOSES INTRALESIONAIS DE EM ESQUEMA DE UMA AMPOLA TRÊS VEZES POR SEMANA ATÉ A CURA CLÍNICA: EFICÁCIA DOS TRATAMENTOS A LONGO PRAZO

Título: Avaliação da eficácia de manutenção de cura a longo prazo após o tratamento da leishmaniose cutânea utilizando-se antimoniais pentavalentes em esquemas alternativos com baixas doses

Running title: Manutenção de cura da leishmaniose com doses baixas de antimonial

R Vieira-Gonçalves¹, RS Nogueira¹, JF Heringer¹, Mendes-Aguiar CO¹, A Gomes-Silva¹, Santos-Oliveira JR¹, AM Da-Cruz¹, MP Oliveira-Neto^{2*}.

Afiliações: ¹Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. ²Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

*Autor correspondente: Manoel Paes Oliveira-Neto. Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas – IPEC-, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro-RJ, Brasil. CEP 21040-900.

Telefone: 00.55.21.38659672.

Endereço eletrônico: manael.paes@ipecc.fiocruz.br

Outros autores: ricardog@ioc.fiocruz.br, rsantos@ioc.fiocruz.br; jfheringer@hotmail.com.br, joannars@ioc.fiocruz.br, gomesas@ioc.fiocruz.br. alda@ioc.fiocruz.br,

Resumo

O uso de drogas parenterais no tratamento da leishmaniose tegumentar Americana dificulta a sua aplicabilidade. O antimonial pentavalente (Sb^{5+}) é a principal droga indicada pelo Ministério da Saúde, e nas doses recomendadas ($15mgSb^{5+}/kg/dia$ por 20 dias) pode desencadear efeitos adversos graves, na maioria das vezes dose-dependentes. O uso desta medicação em doses baixas já foi demonstrado como sendo eficaz no tratamento da leishmaniose cutânea (LC). O objetivo deste trabalho foi verificar a eficácia de manutenção de cura a longo prazo (mais de cinco anos) em pacientes tratados com Sb^{5+} de maneira intralesional (IL) e em esquema com uma ampola três vezes por semana, em dias alternados até a cura clínica ($2^a/4^a/6^a$) independentemente do peso corporal. Foram avaliados 20 pacientes tratados com esquema IL e 10 pacientes tratados com esquema $2^a/4^a/6^a$. Foi observado que 70% dos pacientes IL e 80% dos tratados em esquema $2^a/4^a/6^a$ curaram após o primeiro tratamento instituído. No presente estudo, os pacientes foram avaliados em um período de tempo médio após o tratamento de $16,6 \pm 4,2$ anos nos casos IL e de $6,9 \pm 0,87$ anos nos casos $2^a/4^a/6^a$, e todos se encontravam curados, sem história de recidivas ou evolução para a forma leishmaniose mucosa. As imunoglobulinas tipo IgG1 e IgG3 foram negativas em 80% e 85% dos casos nos dois grupos estudados, e a detecção de DNA parasitário por PCR foi negativa em todos os 22 pacientes testados.

O uso de Sb^{5+} em doses reduzidas mostrou ser capaz de determinar elevados percentuais de cura após o tratamento da LC em pacientes do Estado do Rio de Janeiro, e estes esquemas terapêuticos foram ainda capazes de manter a cura clínica a longo prazo (mais de cinco anos) nestes pacientes. Acreditamos que esquemas terapêuticos em doses baixas devam ser mais recomendados para pacientes de LC quando doses convencionais não são desejadas ou mesmo estão contraindicadas, pelo menos no RJ.

Introdução

O tratamento da leishmaniose tegumentar por vezes é dificultado pelo uso de drogas exclusivamente parenterais. O principal esquema de tratamento indicado pelo Ministério da Saúde (MS 2010) para a leishmaniose cutânea (LC) é o antimonial pentavalente (Sb^{5+}) (Glucantime[®]), preconizado na dose de 15mg/kg/dia, por um período de 20 dias.

O tratamento com antimonial pode causar efeitos adversos, potencialmente graves (Oliveira-Neto et al. 2004, Oliveira et al. 2011), por vezes relacionados à idade dos pacientes (Diniz et al. 2012) e dose dependentes (Neves et al. 2009) que podem até mesmo levar a suspensão do tratamento. Deve-se ainda considerar que a rotina de aplicações diárias, com necessidade de deslocamento do paciente até um centro de saúde para a utilização da medicação via parenteral dificulta o tratamento de indivíduos que residem distantes destes locais, prejudicando também a atividade profissional diária. Estes fatores podem reduzir a adesão ao tratamento e, portanto, a eficácia do mesmo.

Considerando-se que o tratamento irregular da leishmaniose causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis* pode levar a recidivas e ao surgimento de lesões de leishmaniose mucosa (LM) tardias (MS 2010), opções terapêuticas de mais fácil aplicação vem sendo propostas, dentre elas, a aplicação de uma ampola três vezes por semana até a cura clínica (independentemente do peso corporal), uso de formulações tópicas com paramomicina (Santos et al. 2005) fitoterápicos tópicos (Tiuman et al. 2011) ou uso de aplicação intralesional (Oliveira-Neto et al. 1997, Vasconcellos et al. 2012).

Estas opções poderiam ser utilizadas para casos especiais, onde o tratamento convencional pode não ser o mais adequado, ou mesmo está contra-indicado. O objetivo deste trabalho foi analisar a eficácia de manutenção da cura longo tempo após o tratamento (mais de cinco anos) em pacientes de LC que fizeram uso de Sb^{5+} com um dos seguintes esquemas terapêuticos: aplicação intralesional ou uso de uma ampola (405 mg/ Sb^{5+}) três vezes por semana até a cura clínica no tratamento da leishmaniose cutânea

Metodologia

Foram selecionados 277 pacientes que foram diagnosticados e tratados para LC no Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas – IPEC/FIOCRUZ-RJ que realizaram

tratamento alternativo para leishmaniose cutânea há mais de cinco anos. Os esquemas terapêuticos utilizados foram: 1) aplicações intralesionais (IL, n=203) – infiltração de Sb^{5+} nos quatro pontos cardeais da lesão cutânea, até obter o branqueamento total da periferia da lesão; e 2) uso de uma ampola (405mg Sb^{5+} independentemente do peso corporal) (n=74) em dias alternados, três vezes por semana, nos dias de segunda, quarta e sexta feira ($2^a/4^a/6^a$) até a cura clínica. Considerou-se cura clínica a reepitelização das lesões e ausência de eritema local.

Após o mapeamento geográfico-espacial dos casos dos 277 casos, 113 indivíduos foram elegíveis para a busca ativa nas áreas de ocorrência da doença registradas. Após 18 visitas de campo, foram localizados 20 pacientes do esquema IL e 10 do esquema $2^a/4^a/6^a$. (Figura 1).

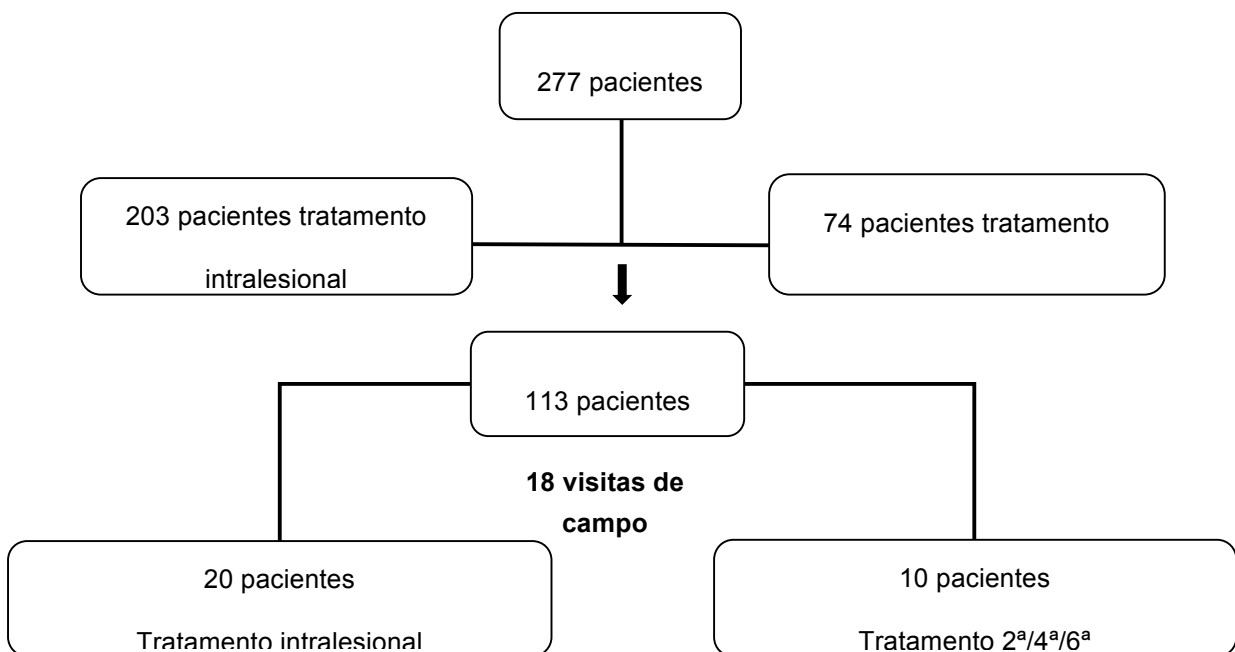


Figura 1: distribuição dos 277 pacientes selecionados para o estudo entre os dois grupos de pacientes estudados - intralesional e em esquema $2^a/4^a/6^a$.

Os outros 83 pacientes foram excluídos por diferentes causas, como observado na Tabela 1.

Tabela 1: Fatores que levaram à exclusão dos pacientes do protocolo de estudo após terminarem as 18 visitas de campo.

Motivos da Exclusão	Número de Pacientes
Endereço inexistente	50
Desconhecidos no endereço	19
Falecimento	5
Áreas de risco por questões de segurança	4
Mudança de endereço	3
Não participação no estudo	1
Perda de prontuário	1
Total	83

Os pacientes foram recrutados por busca ativa nos locais de residência. No momento da visita, foram realizados exame clínico-dermatológico, avaliação do aspecto e registro fotográfico das cicatrizes de LC. Os pacientes foram questionados sobre sintomas de LM, e foi realizado o exame da cavidade oral e nasal por rinoscopia anterior.

Amostras de 5ml de sangue periférico foram coletadas em EDTA para realização de sorologia por ELISA (IgG total e subunidades) e PCR convencional.

Ensaio de ELISA para detecção de anticorpos anti-Leishmania

O protocolo foi realizado como previamente descrito (Fagundes-Silva et al 2012). Resumidamente, antígeno solúvel de promastigotas de *L. braziliensis* (MHOMBR/195/2903) (10 µg/poço 200µl) foi adicionado aos poços das placas de poliestireno (Nunc-immuno Plate, Roskilde, Denmark) e incubados por uma noite em câmara úmida a 4°C. Após lavagem, foi adicionado soro diluído (1:40) e incubado a temperatura ambiente. Após seis lavagens, a placa ficou em incubação com o conjugado “peroxidase-mouse monoclonal anti-human IgG1” (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA). Após uma nova sequência de lavagens, observou-se a reação enzimática e a mudança de cor foi estabilizada com solução específica. A absorvância foi medida com "EMax microplate reader" (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) a 492 nm. Os resultados foram expressos em densidade óptica (DO)

Detecção de DNA de Leishmania por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para isolar o DNA de 300 µl de sangue periférico, utilizou-se o kit “Blood GenomicPrep Mini Spin Kit for DNA” (Ge Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante. O PCR foi realizado de maneira previamente já descrita (Pirmez et al. 1999). Os “Pimers” utilizados foram: HM1 [5’-(CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC)-3], HM2 [5’-(GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA)-3’] e HM3 [5’-(GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC)-3] (Gibco, São Paulo, SP). O volume total utilizado no PCR foi de 25 µl, sob as seguintes condições: 35 ciclos de 30s cada, consistindo em desnaturação a 94°C, anelamento a 54°C e extensão a 72°C. Utilizou-se o termociclador automático “GENEAMP PCR System 9700” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os produtos amplificados (10 µl) foram analisados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (0.5 µg/ml) visualizado em luz ultravioleta.

Resultados

Os prontuários dos 30 pacientes localizados foram analisados, e as características clínicas e epidemiológicas, durante a fase ativa da doença, em seus respectivos grupos de tratamento podem ser vistas na Tabela 2.

Tabela 2: características clínicas durante a fase ativa da leishmaniose cutânea dos pacientes tratados com os esquemas intralesional (IL) e em esquema de tratamento três vezes por semana (2^a/4^a/6^a) até a cura clínica.

Grupo Pacientes	Idade*	Sexo	Número lesões*	Local da lesão	Diâmetro Lesões* cm ²	Tempo de Evolução (dias)*
IL (n = 20)	31 ± 21,7 (5 a 61 anos)	35% M 65% F	1,5 ± 1,0	50% pernas 30,2% braços	7,1 ± 3,6	93,2 ± 35,9
2 ^a /4 ^a /6 ^a (n = 10)	47 ± 21,5 (5 a 69 anos)	50% M 50% F	1,3 ± 1,0**	40% braços 30% face	2,0 ± 1,2	58,5 ± 26,9

M = masculino; F = feminino; n = número de pacientes; *valores médios e desvio padrão; ** excetuando-se um paciente com lesões disseminadas.

Durante a doença ativa a intradermorreação de Montenegro foi positiva em 18/20 pacientes IL (média 23,6 mm ± 12,6) e em 10/10 dos casos 2^a/4^a/6^a (média 20,9 mm ± 7,1). O diagnóstico parasitológico (imprint, histopatologia, cultura ou PCR em fragmento de tecido da lesão de LC) foi positivo em 17/17 pacientes IL e em 7/9 nos casos 2^a/4^a/6^a avaliados.

Dentre os pacientes tratados com esquema IL, 14 (70%) necessitaram de apenas um tratamento intralesional, com dose de três ampolas em média (variando de uma a seis ampolas) e evoluíram com cura clínica. Seis pacientes não obtiveram sucesso terapêutico. Destes, dois casos necessitaram de um segundo ciclo de tratamento IL (aplicado 10 e 30 dias após a primeira aplicação, respectivamente) e evoluíram para cura. Dentre os outros quatro pacientes, dois foram submetidos ao tratamento com dose convencional (10 mg Sb⁵⁺/kg/dia por 21 dias), e os outros dois casos foram tratados com doses de 5 mg Sb⁵⁺/kg/dia por 30 dias. Todos evoluíram para cura clínica. Em nenhum dos casos de retratamento foi observada resistência ao segundo ciclo terapêutico.

Dentre os pacientes que utilizaram o esquema 2^a/4^a/6^a, oito (80%) curaram com o uso de 21 ampolas de antimonial em média (variando de 17 a 32 aplicações). Um destes pacientes apresentava a forma disseminada da doença, com um total de 70 lesões, e obteve-se a cura clínica após aplicação de 28 ampolas. Dois pacientes não tiveram boa resposta inicial a este esquema. Um deles fez uso irregular da medicação, e necessitou um segundo tratamento com dose de 20 mg Sb⁵⁺/kg/dia por 14 dias. O segundo paciente não obteve resposta clínica com uso de 35 ampolas, ocorrendo disseminação de lesões e evoluiu para cura clínica após o uso da dose de 20 mg Sb⁵⁺/kg/dia por 21 dias. Curiosamente, este último paciente apresentou recidiva de uma lesão na pirâmide nasal após seis meses do tratamento com dose convencional. Foi prescrito um terceiro tratamento com 15 aplicações de antimonial no esquema 2^a/4^a/6^a, obtendo-se enfim a cura clínica, mantida até a avaliação atual (sete anos após o fim do tratamento).

No exame clínico atual, foi observada a manutenção da cura clínica em longo prazo em todos os 30 pacientes reavaliados em um período de tempo que variou de 12 a 27 anos nos casos tratados com esquema IL (média 16,6 anos ± 4,2) (Figura 2) e de seis a oito anos (média 6,9 anos ± 0,9) nos casos 2^a/4^a/6^a (Figura 2). Nenhum dos pacientes tratados com ambos os esquemas evoluiu para LM.

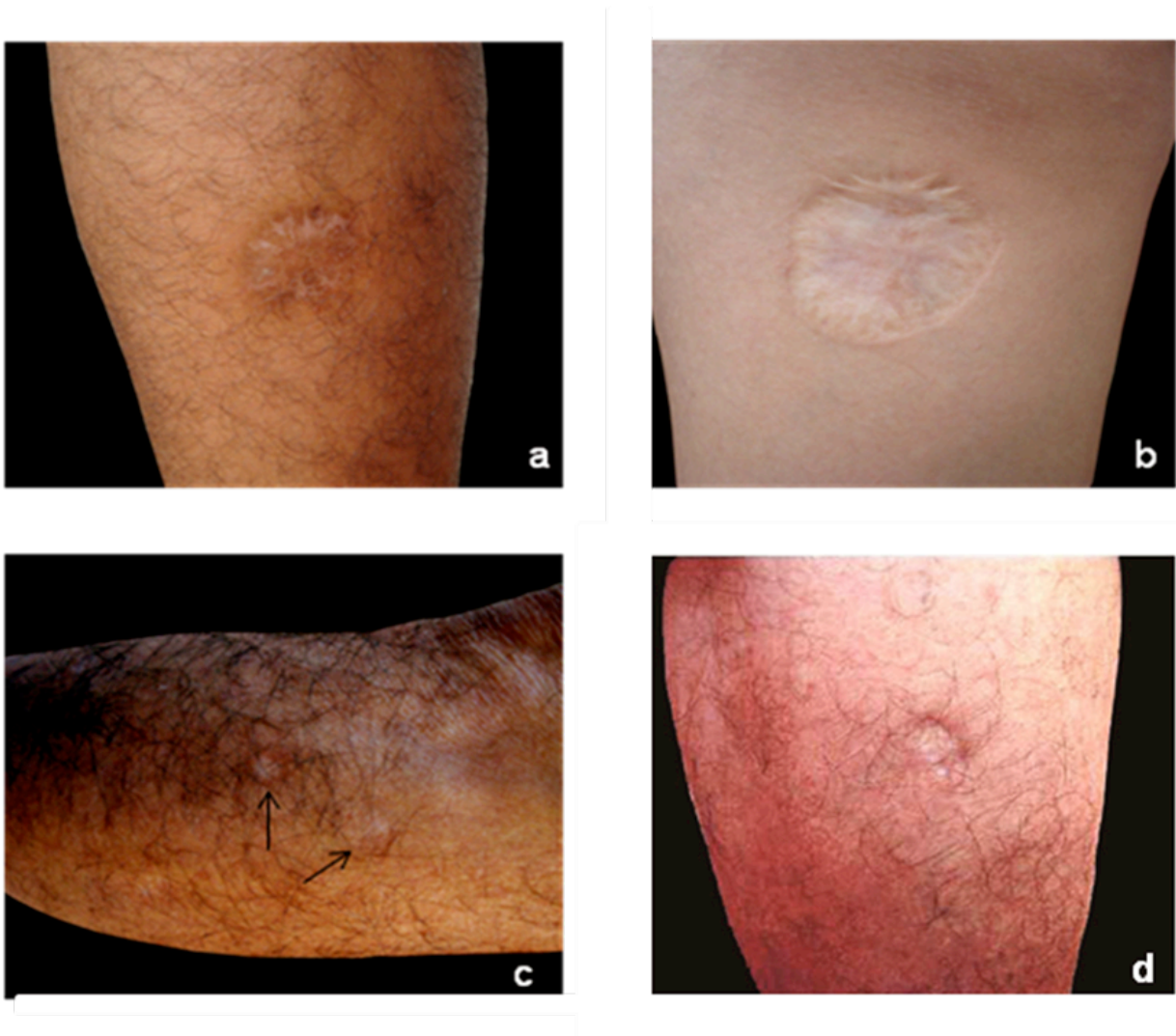


Figura 2: Lesões cicatriciais de leishmaniose cutânea em pacientes tratados com esquema intralesional ou esquema $2^a/4^a/6^a$. Em (a) e (b): manutenção de cura por 14 e 15 anos nas pernas de dois pacientes tratados de forma intralesional. Em (c) e (d): manutenção de cura por sete anos no braço e na perna do paciente com lesões disseminadas tratado com doses $2^a/4^a/6^a$. As setas apontam para as cicatrizes (c).

Em relação às imunoglobulinas ambas os subtipos IgG1 e IgG3 foram negativos na maioria dos pacientes, em igual percentual entre os dois grupos (IgG1 = 80% e IgG3 = 85%).

A detecção de DNA parasitário por PCR convencional no sangue foi negativa em todos os pacientes testados (14/14 IL e em 8/8 do esquema 2^a/4^a/6^a).

Discussão

O uso de tratamentos com antimoniais em esquemas alternativos em pacientes portadores de LC no Rio de Janeiro, embora por vezes realizados independentemente do peso corporal para cálculo de doses, resultam na cura clínica da maior parte dos casos, com índices de cura variando de 80% a 100% dos casos de infecções por *L. braziliensis*. (Oliveira-Neto et al. 1996, Oliveira-Neto et al. 1997).

A aplicação de antimoniais de maneira intralesional para tratamento da LC já foi demonstrada como eficaz, para diferentes espécies de *Leishmania*, não somente no Brasil (Oliveira-Neto et al, 1997, Vasconcellos et al 2012) mas também em outros países (Faghihi & Tavakoli-Kia 2002, Uzun et al. 2004).

No RJ, o sucesso terapêutico com uso parenteral com doses baixas de antimoniais, como a aplicação de uma ampola por dia durante 30 dias (Oliveira-Neto et al. 1996) para LC assim como o uso de doses de apenas 5 mg Sb⁵⁺/kg/dia para LM já foi publicado (Oliveira-Neto et al. 2000). Doses ainda menores como o uso de uma ampola, independentemente do peso corporal, três vezes por semana até a cura clínica de lesões de LC (Oliveira-Neto & Mattos 2006) também foram eficazes. Tratamentos com doses intermitentes costumam ser mais bem tolerados pelos pacientes, e por vezes com resultados melhores do que um tratamento com doses diárias (Azeredo-Coutinho 2002).

Caracterizamos uma boa resposta clínica com uso de doses baixas de Sb⁵⁺ em 30 pacientes portadores de LC. Demonstramos um percentual de cura direta em 80% nos casos tratados com doses no esquema 2^a/4^a/6^a e em 70% dos pacientes que utilizaram tratamento IL. Podemos considerar estes percentuais um bom resultado terapêutico, levando-se em conta a reduzida quantidade de medicação que foi aplicada.

Em um paciente com lesões disseminadas pela pele, o uso do esquema 2^a/4^a/6^a foi eficaz, com aplicação de 28 ampolas para se obter a cura. Este paciente manteve-se curado até o momento da última avaliação dermatológica, que ocorreu sete anos após o tratamento.

Os percentuais de negatividade das imunoglobulinas IgG1 e IgG3 aqui encontrados (80% e 83,5%) foram semelhantes aos níveis evidenciados em pacientes curados com outros esquemas terapêuticos (Fagundes-Silva et al. 2012), evidenciando que os esquemas aqui avaliados podem gerar um perfil imunológico semelhante ao encontrado com outros esquemas de tratamento.

Não foi detectada a presença de DNA de *Leishmania* no sangue dos pacientes analisados, o que sugere que estes tratamentos alternativos possam ter produzido uma cura parasitológica.

O receio de que o uso de doses reduzidas de antimônio poderia levar a resistência da *Leishmania*, ou ao posterior surgimento de LM deve ser sempre considerado. No entanto, em casos onde o uso de doses plenas de antimoniais não podem ser empregados, estes esquemas alternativos têm se mostrado como excelente opção. Deve-se considerar também que o benefício em se prevenir a LM com uso de doses elevadas deve suplantar os riscos de potenciais efeitos adversos desta medicação (Blum et al. 2012). No RJ, onde encontramos pacientes que respondem bem ao uso de doses baixas, esquemas alternativos deveriam ser mais aplicados.

Nos pacientes estudados, não evidenciamos qualquer tipo de resistência a um segundo tratamento antimonial, e a manutenção da cura a longo prazo (mais de 5 anos) aqui observada reforça a provável capacidade de cura clínica permanente com estes esquemas alternativos.

Referências

- Azeredo-Coutinho RB & Mendonça SCF, 2002. An intermittent schedule is better than continuous regimen of antimonial therapy for cutaneous leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 477–481.
- Blum J, Lockwood DNJ, Visser L, Harms G, Bailey MS, Caumes E, Clenix J, Van Thiel PPAM, Morizot G, Hatz C, 2012. Local or systemic treatment for New World cutaneous leishmaniasis? Re-evaluating the evidence for the risk of mucosal leishmaniasis. *Int Health* 4: 153–163.
- Diniz DS, Costa ASV, Escalda PMF, 2012. The effect of age on the frequency of adverse reactions caused by antimony in the treatment of American tegumentar leishmaniasis in Governador Valadaresm State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Trop Bras Med Trop* 45: 597–600.
- Faghihi G & Tavakoli-Kia R, 2002. Treatment of cutaneous leishmaniasis with either topical paramomicin or intralesional meglumine antimoniate. *Clin Exp Dermatol* 28: 13-16.
- Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, Andrade CA, 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica* 118: 87-96.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Araujo ML, Pirmez C 1996. High and low doses of antimony (Sb^v) in American cutaneous leishmaniasis. A five years of follow-up study of 15 patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 207-209.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC, Pirmez C, 1997. A low-dose antimony treatment in 159 patients with Americam cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg* 57: 651-655.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC, Pirmez C, 1997. Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil – an area of *Leishmania (V.) braziliensis* transmission. *Int J Dermatol*, 36: 463-468.
- Oliveira-Neto MP, Mattos M, Pirmez C, Fernandes O, Goncalves-Costa SC, Souza CFS,

- Grimaldi Junior G, 2000. Mucosal leishmaniasis (“Espundia”) responsive to low dose of N-methyl glucamine (Glucantime^R) in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 42: 321-325.
- Oliveira-Neto MP, Mattos M, Cuzzi-Maya T, Pirmez C 2004. Paniculite eosinofílica localizada em consequência de injeções intramusculares de composto de antimônio para tratamento de leishmaniose tegumentar americana. *An Bras Dermatol* 79: 463-469.
- Oliveira-Neto MP & Mattos MS, 2006. An alternative antimonial schedule to be used in cutaneous leishmaniasis when high doses of antimony are undesirable. *Rev Soc Bras Med Trop* 39 323–226.
- Neves DBJ, Caldas ED, Sampaio RNR, 2009. Antimony in plasma and skin of patients with cutaneous leishmaniasis – relationship with side effects after treatment with meglumine antimoniate. *Trop Med Int Health* 14: 1515-1522.
- MS – Ministério da Saúde, Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana 2010, acessado em dezembro de 2013. Disponível em:
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_america.pdf
- Vasconcellos ECF, Pimentel MIF, Schubach AO, Oliveira RVC, Azeredo-Coutinho RB, Conceição-Silva F, Salgueiro MM, Moreira JS, Madeira MF, Batista C, Valete-Rosalino CM, 2012. Short report: intralesional meglumine antimoniate for treatment of cutaneous leishmaniasis patients with contraindication of systemic therapy from Rio de Janeiro (2000-2006). *Am J Trop Med Hyg* 87: 257–260.
- Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Nakamura CV, 2011. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis*, 15: 525-532.
- Uzun S, Durdo M, Culia G, Allahverdiyev AM, Memisoglu HR, 2004. Clinical features, epidemiology, and efficacy and safety of intralesional antimony treatment of cutaneous leishmaniasis: recent experience in Turkey. *J Parasitol* 90: 853-859.

6 – DISCUSSÃO FINAL

Dentre as lacunas do conhecimento a cerca da LTA a área onde houve menos evolução é a que diz respeito às questões relacionadas ao tratamento da doença. Há mais de um século foi descoberto por Gaspar Vianna a primeira droga realmente eficaz contra o parasito: os antimoniais (Dutra & Silva 1915). Desde então, poucas outras opções terapêuticas foram implementadas, com apenas mais duas drogas de uso recomendado pelo MS (2010): a anfotericina B e a pentamidina. Outras medicações foram estudadas e ainda estão em estudo como a paramomicina (Kim et al. 2009), e a mais promissora delas, o miltefosine, já eficaz para leishmaniose visceral e ainda em análise em diversos estudos para a LC (Soto et al. 2004, Machado et al. 2010, Dorlo et al. 2012).

Estudos de revisão sistemática indicam a importância de realização de estudos terapêuticos não somente com novas drogas, mas também com as drogas já utilizadas para tratamento da LTA (Santos et al. 2008, Gonzales et al. 2010, Almeida et al. 2011, Olliaro et al. 2013, Reivez et al. 2013).

Uma vez que são reduzidas as opções de drogas para tratamento da LTA, estudos que avaliem a eficácia das medicações já existentes em diferentes formas de aplicação podem ser de grande valia. A principal droga indicada pelo MS, o antimonial pentavalente, apresenta resposta terapêutica variada, dependendo da região estudada (Oliveira-Neto et al. 2000, Romero et al. 2011, Jiramus et al. 2012). No RJ a LTA apresenta um aspecto benigno em termos de cura, com resposta terapêutica bastante satisfatória mesmo em tratamentos com doses de antimoniais inferiores às recomendadas pelo MS (Oliveira-Neto et al. 1996, 1997 e 2000, Vasconcellos et al. 2012).

Neste trabalho, investigamos a eficácia de manutenção da cura de lesões de LC em 100 pacientes que foram tratados com diferentes doses de antimonial pentavalente: 33 pacientes que utilizaram as doses convencionais pelo MS (15 mg Sb^{5+} /kg/dia, por 30 dias) e 67 tratados com doses reduzidas desta medicação (37 com doses de 5 mg Sb^{5+} /kg/dia por 30 dias, 20 de aplicação intralesional, e 10 pacientes em um esquema com doses ainda menores, de uma ampola (405 mg Sb^{5+}) três vezes por semana até a cura clínica). Todos os pacientes estudados eram provenientes do RJ, fizeram o tratamento com antimonial pentavalente em diferentes

doses e foram analisados em média entre seis e 27 anos após o tratamento. Em todos os casos foi observada a manutenção de cura a longo prazo no momento da avaliação atual, durante a qual não foi detectada recidivas ou evolução para LM.

O sucesso terapêutico imediato foi alcançado em 86,5% dos casos que fizeram tratamento com doses de 5 mg Sb⁵⁺/kg/dia, 80% no tratamento em esquema 2^a/4^a/6^a, e em 70% dos casos IL. No total de 67 pacientes analisados, apenas 13 (19,4%) não obtiveram a cura imediata com o primeiro tratamento.

Em termos comparativos, os grupos tratados com doses baixas de 5 mg Sb⁵⁺/kg/dia por 30 dias e tratados com doses regulares de 15 mg Sb⁵⁺/kg/dia por 30 dias foram considerados clinicamente semelhantes durante a fase ativa da doença. Apenas um paciente em cada grupo (2,7% e 3%, respectivamente no grupo de DB e de DC) evoluiu para LM, entre um e três anos após o fim da terapia. No entanto, a evolução para LM é estimada em 3 a 5% dos casos de LC no Brasil (MS 2010).

Na avaliação clínica atual, todos os pacientes permaneceram curados, sem surgimento de recidivas ou evolução para LM, mesmo mais de cinco anos após o tratamento, independentemente do tipo de tratamento que utilizaram, tenha sido DR, DB, aplicação intralesional ou em esquema 2^a/4^a/6^a.

O perfil de imunoglobulinas tipo G encontrado foi similar aos níveis previamente encontrados em pacientes curados (Fagundes-silva et al. 2012), ratificando a idéia de que estes níveis de IgG decrescem com o tempo de cura, e que, no entanto alguns pacientes podem manter a positividade por longo tempo. Muitos dos pacientes estudados residem próximos ou mesmo dentro de regiões ainda com importante cobertura vegetal. Apesar de não termos encontrado diferenças significativas entre a positividade das IgGs e a proximidade dos indivíduos com a mata, é possível que esta proximidade favoreça novos contatos com flebotomíneos infectados, que poderiam estar gerando uma nova estimulação antigênica nestes indivíduos, e conseqüente positividade nestas dosagens.

As reações de PCR no sangue foram negativas na maior parte dos indivíduos avaliados (71/76 casos). Este fato já era esperado, visto apresentarem em média mais de 10 anos de cura clínica. Em cinco pacientes que foram tratados com doses convencionais, esta reação foi positiva. Acreditamos que possivelmente estes indivíduos podem ter sido recentemente re-

expostos, visto que, pelo menos três deles exerceram atividades profissionais diariamente dentro da floresta, na região de Paraty.

Foi demonstrando que os níveis de citocinas do tipo 1 (IFN- γ e TNF) e tipo 2 (IL-4 e IL-10) foram similares nos grupos tratados com DB e DR. Isso pode indicar que o uso de diferentes doses de Sb⁵⁺ para o tratamento da LC, pode não ter interferido com o perfil de resposta imune duradoura, que deve ser aquela provavelmente associada à cura clínica. Entretanto, a análise da produção de IL-6 mostrou que esta foi mais elevada nos pacientes tratados com DB. Uma hipótese é que poderia ocorrer uma exposição do sistema imune por antígenos de *Leishmania* por tempo mais prolongado no grupo DB do que no DR. Assim, possivelmente o estímulo antigênico foi mais duradouro no DB do que aquele gerado no grupo DR. Embora a IL-6 seja conhecida por seu papel pro-inflamatório, recentemente foram demonstrados mecanismos envolvidos na indução de células Tr1 produtoras de IL-10 e sua importância na contenção da inflamação tecidual nas doenças autoimunes (Jin et al. 2013). Na leishmaniose já havia evidências de sua ação, visto que altos níveis desta citocina foram implicados na regulação da resposta pro-inflamatória em indivíduos com LTA, o que potencialmente poderia estar associado ao baixo risco de evolução para LM (Castelucci et al. 2006).

Uma vez que tanto os pacientes tratados com DB quanto os DR permaneceram clinicamente curados, o papel funcional da IL-6 gerada pelo tratamento com DB na manutenção da resposta imune reguladora anti-*Leishmania*, necessita ser melhor investigado. Esses resultados serão associados com o fenótipo de diferenciação das células induzidas nesses pacientes curados a longo tempo pós-tratamento, cujos experimentos estão em andamento.

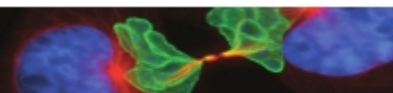
Em resumo, os resultados mostram evidências clínicas e imunológicas de que o uso de reduzidas doses de antimonial são tão seguras e eficazes quanto as doses regulares para a cura e a manutenção de cura mesmo longo tempo após o término do tratamento, fato este que ainda não havia sido demonstrado anteriormente para períodos tão longos quanto acima de dez anos. Esses resultados podem se constituir em um indicativo para subsidiar a validação do uso de baixas doses de antimonial como indicação terapêutica da LC para pacientes de áreas endêmicas do RJ, ou em outras áreas em que os pacientes tenham boa resposta terapêutica a esta droga, em substituição às doses preconizadas pelo Ministério da Saúde.

7 - CONCLUSÕES

- ✓ Este estudo constituiu-se no primeiro trabalho a estudar pacientes tratados com doses baixas de antimoniais pentavalentes reavaliados em tempos médios superiores a 10 anos após o tratamento.
- ✓ O tratamento da leishmaniose cutânea com doses alternativas de antimonial pentavalente foi considerado eficaz em manter a cura clínica a longo prazo, visto que evoluções clínicas desfavoráveis como recidivas ou evolução para forma leishmaniose mucosa não foram observadas nos grupos estudados.
- ✓ O tratamento com doses de 5 mg Sb⁵⁺/kg/dia por 30 dias foi tão eficaz quanto o uso de doses regulares de 15 mg Sb⁵⁺/kg/dia por 30 dias na manutenção de cura clínica a longo prazo, assim como a utilização de doses intralesionais ou do esquema com doses de apenas uma ampola três vezes por semana até a cura clínica
- ✓ A presença de DNA de *Leishmania* no sangue foi evidenciada em 5/23 casos tratados com doses regulares, indicando que a persistência parasitária pode existir. No entanto, não foi possível determinar se houve reexposição (interna ou externa), tão pouco a relação com a manutenção do estímulo antigênico do sistema imune;
- ✓ Os níveis de IgG produzidos por pacientes tratados com diferentes doses de antimoniais pentavalentes foram similares, evidenciando que a sua dinâmica de resposta de linfócitos B parece independe do tipo de tratamento empregado;
- ✓ O perfil de citocinas tipo 1 e tipo 2 foi similar entre os grupos comparados, o que pode significar que a aplicação de doses reduzidas de antimonial não interferem neste perfil de resposta imune protetora e duradoura. A detecção de níveis mais elevados de IL-6 nos pacientes tratados com DB pode estar relacionado a sua função reguladora, mas o

mecanismo exato necessita ser investigado, assim como a correlação positiva entre IFN- γ e IgG1, visto que todos os pacientes encontram-se clinicamente curados;

- ✓ Neste trabalho foi demonstrado que o uso de doses reduzidas de antimonial pentavalente foi equivalente ao esquema com doses regulares em termos de prognóstico e de manutenção da cura clínica em longo prazo. Estes resultados trazem evidências de que, em áreas endêmicas onde o perfil de resistência do parasito ao Sb⁵⁺ seja baixo, como é o caso do Estado do Rio de Janeiro, o uso destes esquemas alternativos poderia ser considerado pelo Ministério da Saúde como uma opção dentre as recomendações de tratamento da leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*.



Brief Definitive Report

Decrease in anti-Leishmania IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure

G. A. FAGUNDES-SILVA,¹ R. VIEIRA-GONCALVES,¹ M. P. NEPOMUCENO,² M. A. DE SOUZA,³ S. FAVORETO JR,⁴ M. P. OLIVEIRA-NETO,⁵ A. M. DA-CRUZ¹ & A. GOMES-SILVA¹

¹Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas MØdicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, ²Universidade EstÅcio de Sµ, Faculdade de Medicina, Rio de Janeiro, Brazil, ³Instituto de Ciªncias BiomØdicas, Universidade Federal de Uberlªndia, Uberlªndia, MG, Brazil, ⁴Allergy and Immunology Division, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL, USA, ⁵Instituto de Pesquisa Clªnica Evandro Chagas (IPEC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

SUMMARY

For better efficiency in the establishment of American tegumentary leishmaniasis clinical cure, the World Health Organization suggests that the clinical criteria are supported by serologic data. The present study aims to investigate the dynamics of IgG subclass production in clinical evolution post-treatment of cutaneous leishmaniasis (CL). Paired sera from 23 subjects with CL resulting from *Leishmania braziliensis* infection were studied during the active lesion phase (aCL) and after clinical cure post-therapy (hCL), which included an alternative protocol with a low dose of antimony. Anti-Leishmania IgG and its subclasses were measured using ELISA, and the immunoglobulin levels were correlated with patients' clinical data. All of the subjects were clinically healed and did not present relapse during follow-up. Serum levels of anti-Leishmania IgG ($r = -0.79$; $P < 0.0001$), IgG1 ($r = -0.64$, $P < 0.001$) and IgG3 ($r = 0.42$, $P < 0.045$) in hCL were negatively correlated with the duration of clinical cure. After 24 months of clinical cure, 73% of samples were negative for IgG1 and 78% were negative for IgG3. In conclusion, the detection of serum anti-Leishmania IgG1 and IgG3 is an improved laboratory strategy to aid in the decision of interruption of the ambulatory follow-up of CL patients.

Keywords clinical cure, cutaneous leishmaniasis, ELISA, IgG1, IgG3, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, low dose antimony, therapeutic efficacy

INTRODUCTION

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is one of the priority diseases of the World Health Organization (WHO) (1). There is no effective strategy to prevent ATL, and patient treatment is a key intervention of disease control. A certification of ATL remission is nearly always based on clinical characteristics, predominately on the visual aspect of scars. Despite apparent visual healing, parasites can persist for up to several years after healing of the lesion (2,3), and inflammatory sites can be observed by histological analyses (4). Therefore, the remission of lesions after treatment is not always permanent, and prognosis can be uncertain because patients can reactivate or even develop mucosal disease (5).

Considering the difficulty in predicting the prognosis of ATL patients (6), an evaluation of immunological parameters is important for the clinical monitoring of ATL post-therapy. Anti-Leishmania antibody levels may vary according to parasite load (7), the duration of infection (8), *Leishmania* species (9,10) and inherent host factors (7). Several authors have positively correlated the clinical cure of ATL with a decline in anti-Leishmania immunoglobulins (11–14). The WHO suggests that the clinical criteria of cure of ATL could be supported by serological methods (15). However, these methods are not yet currently used in clinical practice, which is partly due to the history of low efficiency in the detection of anti-Leishmania antibodies. This study aims to evaluate the dynamics of anti-Leishmania

Correspondence: Adriano Gomes-Silva, Av. Brasil 4365, Pavilhão Cardoso Fontes térreo, Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, CEP 21040-900, Brazil (e-mail: gomesas@ioc.fiocruz.br).

Disclosures: The authors have no conflict of interest to declare.

Received: 11 December 2011

Accepted for publication: 14 June 2012

IgG subclass production at different times after the healing of CL lesions.

MATERIALS AND METHODS

Characterization of patients

Twenty-three subjects with an established diagnosis of CL were followed-up after discharge from a health unit from Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FIO-CRUZ. The group was composed of 16 men (mean age, 36.4 years; age range, 18–55 years) and seven women (mean age, 34.4 years; age range, 15–58 years). All of the patients were from Rio de Janeiro State, Southeast of Brazil, which has endemic areas for *Leishmania braziliensis*. Most of the patients (74%) lived near or inside the forest. Sera were collected during active CL (aCL; duration of illness = 66.8 ± 36.1 days; median, 60 days) and after the clinical healing of CL (hCL; duration of healing = 36 ± 14 months; median, 36 months). All of the subjects fulfilled the clinical, epidemiological, parasitological and immunological diagnostic criteria for ATL (16).

Patients were treated with pentavalent antimony. Twenty cases used low doses (<10 mg/kg/day), as described by Oliveira-Neto and colleagues (5). In this group, 17 patients were cured, and three other cases needed one complementary course of antimonial (10–20 mg/kg/day) before clinical cure was achieved. Three patients received one course of antimonial treatment (10–20 mg/kg/day) for 20 days as the first therapeutic intervention and were also cured. Regardless of the therapeutic regimen, all of the patients showed lesion healing, which persisted without recurrence until the last examination.

Patients were characterized by anthropometrical, clinical and laboratorial aspects, as described in Table 1. Twenty-one healthy subjects (HS; mean age, 30.5 years; age range, 22–45 years) were selected by the following criteria: no scars suggestive of CL, no history of family or 'neighbours leishmaniasis' cases and negative in vitro cellular immune response against *L. braziliensis* antigens.

ELISA for detection of anti-leishmanial immunoglobulins

The immunoassay protocol was performed as previously described (17). Briefly, *L. braziliensis* promastigote (MHOM/BR/195/2903) soluble antigen (10 µg/well) was added to a polystyrene flat-bottom microtitre plate (Nunc-immuno Plate, Roskilde, Denmark) and incubated at 4°C overnight in a humidified chamber. After washing, diluted sera (1 : 40) were added and incubated at room temperature. After six washes, the plate was incubated with peroxidase-conjugated mouse monoclonal anti-human IgG

(catalog number 62-6620, Invitrogen, San Francisco, CA, USA) and monoclonal anti-human IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 (HP6070 clone, HP6014 clone, HP6047 clone and HP6023 clone, respectively – Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA). After another round of washes, the enzymatic reaction was developed, and colour evolution was stopped with a stop solution. The absorbance was measured with an EMax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 492 nm and expressed as optical density (OD).

Statistical analysis

The cut-off values were determined using a receiver operating characteristic curve (ROC curve). Kruskal–Wallis and Spearman's test were used for comparison and correlation analysis, respectively, using GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Serum samples were collected during active disease and at different periods after clinical cure. The ELISA specificity for the detection of anti-*Leishmania* antibodies was 97.8%. IgG, IgG1 and IgG3 quantitation reached 100% sensitivity, while the sensitivity for IgG2 and IgG4 was below 70%.

Immunoglobulin levels found in aCL were not associated with clinical characteristics, such as duration of illness, the enlargement of draining lymph nodes, the number, size or anatomical location of lesions and Montenegro skin test indurations. Interestingly, patients living nearest to or within the forest ($n = 13$) had higher IgG and IgG1 levels than did patients from urban areas ($n = 4$) ($P < 0.05$).

All of the aCL patients had a positive OD for the tested Igs, and a significant decrease in these levels was observed for hCL (Figure 1a–c; $P < 0.0001$). However, four patients presented OD values that were maintained or even augmented when samples were tested for IgG (four patients), IgG1 (three patients) and IgG3 (one patient) (Figure 1a–c, respectively). These four patients were followed-up for <12 months. Similar Ig levels were detected independently of the therapeutic protocol used. At 24 months after healing, the percentage of hCL subjects presenting negative samples was 73% for IgG1 and 78% for IgG3, while only 37% were negative for total IgG (Figure 1d–f, respectively). OD values calculated for hCL were negatively correlated with the duration of clinical cure for IgG ($r = -0.67$; $P < 0.0004$), IgG1 ($r = -0.64$, $P < 0.001$) and IgG3 ($r = -0.42$; $P < 0.045$) (Figure 1d–f, respectively).

Table 1 Anthropometrical, clinical and laboratorial data from cutaneous leishmaniasis patients during active lesion and after heal

Patient number	Age	Number of lesions	Lesion area (cm ²) ^a	Location of lesions	Disease duration (days)	MST (mm)	Amastigote presence in lesion	Sb ⁺⁵ dose	Duration of clinical cure (months)	IgG (OD)		IgG1 (OD)		IgG3 (OD)	
										aCL	hCL	aCL	hCL	aCL	hCL
1	42	1	2.8	Upper limb	60	12	Pos	Ld	37	2.874	2.016	0.445	0.092	0.254	0.064
2	32	1	6.9	Lower limb	30	12	Pos	Ld	34	2.863	1.663	0.628	0.110	1.351	0.157
3	46	1	1.6	Upper limb	90	22	Neg	Ld	18	3.563	2.009	0.677	0.143	1.517	0.248
4	24	1	9.4	Upper limb	120	26	Neg	Ld	48	3.679	1.667	0.890	0.082	0.917	0.135
5	23	3	NR	Trunk	60	30	Neg	Ld	38	3.175	2.096	1.921	0.164	0.398	0.057
6	43	1	2.2	Neck	60	21	Neg	Ld	38	2.905	1.516	0.584	0.046	1.363	0.120
7	16	1	3.1	Lower limb	45	9	Pos	Ld	12	3.000	3.364	1.156	0.254	1.138	0.120
8	43	1	6.1	Lower limbs	60	12	Pos	Ld	45	3.436	1.216	0.517	0.017	0.348	0.138
9	24	2	NR	Lower limb	180	20	Pos	Ld	36	2.774	1.908	0.396	0.064	0.922	0.563
10	46	1	2.1	Face	60	24	Pos	Ld	30	2.198	1.822	0.162	0.056	0.448	0.241
11	20	1	NR	Lower limb	NI	16	Neg	Ld	52	3.120	1.467	1.502	0.070	1.750	0.099
12	46	3	29.4	Face, upper and lower limbs	90	27	Pos	Ld	11	2.491	3.380	0.404	0.258	1.107	0.400
13	34	1	7.0	Trunk	90	NR	Pos	Ld	3	2.048	2.995	0.200	0.627	1.214	1.383
14	55	2	0.2	NI	30	18	Pos	Ld	23	3.032	1.606	0.249	0.088	0.340	0.096
15	58	2	2.4	Face	60	15	Pos	Ld	24	3.491	1.583	0.605	0.058	0.891	0.062
16	38	1	0.2	Upper limb	90	25	Pos	Ld	51	3.352	0.797	0.311	0.010	1.205	0.182
17	55	6	0.2	NI	90	17	Pos	Ld	29	2.110	1.097	0.205	0.014	0.391	0.219
18	41	1	2.9	Upper limbs	15	NR	Pos	Ld + Cd	36	2.896	1.513	0.640	0.055	0.767	0.180
19	15	1	1.3	Face	30	7	Pos	Ld + Cd	38	3.098	2.475	1.108	0.201	1.355	0.391
20	28	1	3.9	Neck	60	NR	Neg	Ld + Cd	8	2.692	3.604	0.411	0.521	0.465	0.300
21	18	1	2.8	Lower limbs	60	19	Neg	Cd	48	2.655	0.581	0.552	0.049	0.498	0.137
22	35	2	NR	Lower limbs	30	23	Pos	Cd	42	2.933	1.586	0.493	0.052	0.792	0.103
23	41	>10	0.7	NI	60	4	Neg	Cd	20	3.858	3.130	1.804	1.334	0.679	0.219

MST, Montenegro skin teste during active disease; Sb⁺⁵, pentavalent antimonial; aCL, active cutaneous leishmaniasis; hCL, healed cutaneous leishmaniasis; NR, not realized; NI, not informed; Ld, Low Sb⁺⁵ dose; Cd, conventional Sb⁺⁵ dose; OD, optical density.

^a In cases of more than one lesion the diameter of the largest one was considered.

DISCUSSION

Currently, serological techniques have increased the sensitivity and/or specificity of the diagnostic tests used for ATL, especially for CL (14,17,18). Earlier work has demonstrated that measurement of IgG subclasses by ELISA or flow cytometry leads to improved diagnosis of ATL (14,18,19). In this study, we have shown that the specificity and sensitivity of the immunoassay are improved by the use of soluble antigens derived by ultracentrifugation of *L. braziliensis* promastigotes. The measurement of anti-Leishmania IgG1 or IgG3 appears to be a good choice for following up treated CL patients. Although some authors have suggested that the use of species-specific antigens increases the sensitivity of immunoassays (17,20), others have found that the use of heterologous Leishmania antigens did not result in a reduction in efficacy (14).

A considerable decrease in anti-Leishmania Ig levels is generally observed after CL healing (11–14,21). In this study, only four patients maintained high Ig levels after therapy, and all of them experienced clinical cure in <12 months. These results are expected if a prolonged period after clinical cure is required for the host's specific immune system to achieve homeostatic equilibrium (2,22). These four patients will be monitored to confirm the reduction in anti-Leishmania IgG1 and IgG3 following clinical cure. These results indicate that anti-Leishmania IgG1 and IgG3 are not useful as early cure criteria for successful therapy, as proposed for visceral leishmaniasis (23). However, these IgG subclasses can constitute a valuable biomarker to assist the clinical cure criteria during the 2 years of CL follow-up.

The majority of patients after two or more years of clinical cure had anti-Leishmania IgG1 and IgG3 levels similar to those observed in individuals with no history of

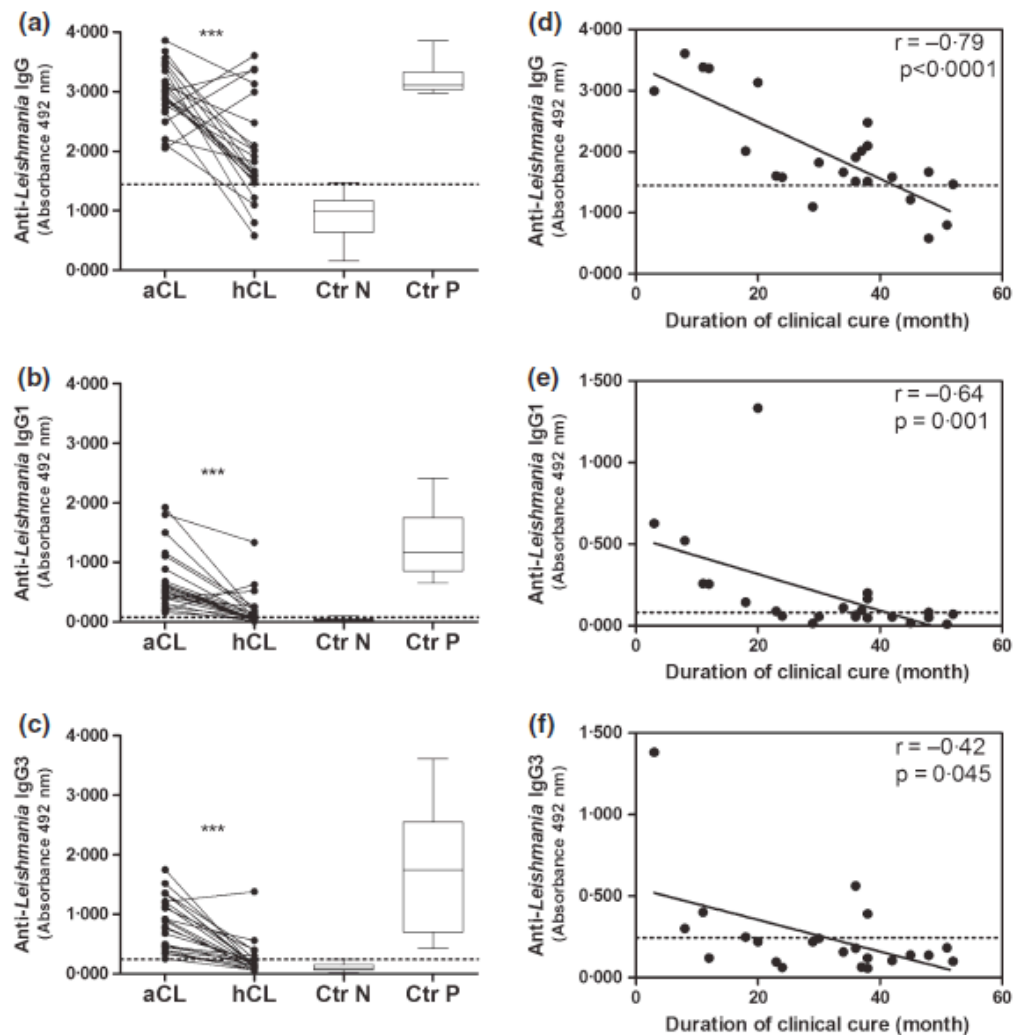


Figure 1: Reactivities of cutaneous leishmaniasis patient sera in ELISA. (a–c) Show the optical densities for paired serum samples during active cutaneous leishmaniasis (aCL) and after lesion healing (hCL) for anti-Leishmania IgG, IgG1 and IgG3, respectively. Three asterisks indicate $P < 0.001$. Box and whisker plots indicate the reactivities of the negative (Ctr N, $n = 21$) and positive controls (Ctr P, sera from aCL with high levels of total IgG and its subclasses, $n = 5$) for the ELISA reactions. The dotted line indicates the cut-off value. (d–f) Show the correlations between the absorbance and the duration of clinical cure in months for anti-Leishmania IgG, IgG1 and IgG3, respectively. The dotted line indicates the cut-off value. The straight slope represents the correlation curve. Each point represents one subject. r , correlation coefficient; P , statistical significance.

Leishmania infection. Because Ig levels may be correlated with parasitic burden (7), a conversion to negative Ig levels could indicate that our patients have controlled the Leishmania infection. In this study, we showed that anti-Leishmania IgG3 and IgG1 levels decreased in patients after therapy, even when low doses of antimony were used. A previous report comparing unpaired groups of patients showed that anti-Leishmania IgG3 and IgG1 levels were lower 1 year after healing than during active disease (21). Finally, it was curious to note that patients living nearest to or within the forest had augmented levels of IgG and IgG1, which could reflect a continuous exposure to sand fly bites.

In conclusion, the detection of serum anti-Leishmania IgG1 and IgG3 is an improved laboratory strategy for aiding the decision on interruption of the ambulatory follow-up of patients. Why anti-Leishmania IgG1 and IgG3 levels diminish faster than total IgG after clinical cure remains

unanswered. Subjects who present sustained or increased levels of serologic reactivity for paired samples should be monitored for periods longer than 2 years. These patients can maintain an elevated parasite burden, which in turn sustains immune system activation, conditions suggestive of a poor prognosis.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Mr. Nogueira RS for his help with the experimental procedures and for his intellectual contribution to our study. We are also grateful to Ms. Rosangela Pellegrino for secretarial assistance.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

The authors of this article contributed equally to this work. GAFS, MPN, RVG and AGS designed the study

protocol and analysed and interpreted the data. MPON, RVG and AMC performed the clinical assessment and follow-up of patients. AMC, MAS and SFJ contributed to drafting, writing and revising the manuscript. All of the authors read and approved the final manuscript. AGS and GAFS are guarantors of the paper.

FUNDING

This work was supported by a grant from Instituto Oswaldo Cruz – Internal funding, CNPq, FAPERJ. GAFS

REFERENCES

- 1 WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 2010. WHO technical report series; no. 949.
- 2 Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania* (Viannia) braziliensis persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 824–827.
- 3 Mendonça MG, de Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML & Abath FG. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis* 2004; 189: 1018–1023.
- 4 Morgado FN, Schubach A, Vasconcelos E, et al. Signs of an in situ inflammatory reaction in scars of human American tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2010; 32: 285–295.
- 5 Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC & Pirmez C. Treatment of American cutaneous leishmaniasis: a comparison between low dose (5mg/kg/day) and high dosage (20mg/kg/day) antimony regimens. *Pathol Biol* 1997; 45: 496–499.
- 6 Netto EM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, et al. Long-term follow-up of patients with *Leishmania* (Viannia) braziliensis infection and treated with Glucantime. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 367–370.
- 7 Gutierrez Y, Salinas GH, Palma G, Valderrama LB, Santrich CV & Saravia NG. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45: 281–289.
- 8 Trujillo C, Ramirez R, Vólez ID & Berberich C. The humoral immune response to the kinetoplast membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunol Lett* 1999; 70: 203–209.
- 9 Romero GA, Orge MG, Guerra MVF, Paes MG, Macêdo VO & Carvalho EM. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania* (Viannia) braziliensis or *Leishmania* (Viannia) guyanensis in Brazil. *Acta Trop* 2005; 93: 49–56.
- 10 Matta NE, Nogueira RS, Franco AMR, et al. *Leishmania* (Viannia) guyanensis induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the Brazilian Amazon Highland. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80: 339–344.
- 11 Delgado O, Guevara P, Silva S, Belfort E & Ramirez JL. Follow-up of a human accidental infection by *Leishmania* (Viannia) braziliensis using conventional immunologic techniques and polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 267–272.
- 12 Amato VS, Duarte MI, Nicodemo AC, et al. An evaluation of clinical, serologic, anatomopathologic and immunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1998; 40: 23–30.
- 13 Brito ME, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML & Abath FG. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 203–206.
- 14 Junqueira-Pedras M, Orsini M, Castro M, Passos VMA & Rabelo A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47: 477–485.
- 15 WHO. Control of Leishmaniasis: report of a WHO Expert Committee, Geneva, 1990. WHO technical report series, no. 793.
- 16 Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 251–256.
- 17 Gomes-Silva A, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, et al. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania* (*Leishmania*) amazonensis and the *Leishmania braziliensis* complex. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41: 135–141.
- 18 Pissinatti JF, Gomes IT, Peruhype-Magalhães V, Dietze R, Martins-Filho OA & Lemos EM. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *J Immunol Methods* 2008; 336: 193–202.
- 19 Souza MA, da Silva AG, Afonso-Cardoso SR, Favoreto SJ & Ferreira MS. Immunoglobulin isotype and IgG subclass profiles in American tegumentary leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38: 137–141.
- 20 Barroso-Freitas AP, Passos SR, Mouta-Conforti E, et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 103: 383–389.
- 21 Castellano LR, Filho DC, Argiro L, et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol* 2009; 70: 383–390.
- 22 Gomes-Silva A, Pereira-Carvalho R, Fagundes-Silva G, Oliveira-Neto MP & Da-Cruz AM. Homeostasis of specific immune response in clinically cured cutaneous leishmaniasis subjects due to *Leishmania* (Viannia) braziliensis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42: 147–150. Suplemento II.
- 23 Gomes IT, Carvalho SF, Rocha RD, et al. Anti-*Leishmania chagasi* immunoglobulin G3 detected by flow cytometry for early cure assessment in American visceral leishmaniasis. *J Immunol Methods* 2010; 360: 76–83.

and AGS were sponsored through CNPq. AMC is a research fellow from CNPq and FAPERJ (JCNE).

ETHICAL APPROVAL

This study was approved by the Ethics Board of the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (007/11).

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Reactivities of cutaneous leishmaniasis patient sera in ELISA. A and B show the optical densities for paired serum samples during active cutaneous leishmaniasis (aCL) and after lesion healing (hCL) for anti-Leishmania IgG2 and IgG4, respectively.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

ANEXO II

Dados referentes ao cruzamento de dados LTA/AIDS

A leishmaniose tegumentar Americana (LTA) é endêmica em todo o Estado do Rio de Janeiro (RJ) (MS 2010). Dados do Ministério da Saúde indicam que entre 2001 e 2012 houve 2221 casos registrados de LTA no RJ neste período (SINAN 2014). A epidemia de AIDS que afeta todo o país apresenta um número crescente de casos a cada ano, e de acordo com o MS, foram notificados no Brasil até 2010 um total de 608.230 casos desta doença (Boletim Epidemiológico do MS 2011).

O primeiro relato de coinfeção leishmaniose cutânea/AIDS no Brasil ocorreu em 1987 (Coura et al. 1987), e desde então poucos estudos de coinfeção foram publicados (Machado et al. 1992, Amato et al. 2000, Posada-Vergara et al. 2005, Lindoso et al. 2009, Carnauba Jr et al. 2009, Guerra et al. 2011 e Rodrigues et al. 2011). Em relação aos casos de pacientes do RJ, este número de publicações é ainda menor (Coura et al. 1987, Da-Cruz et al. 1992, Mattos et al. 1998).

Nos pacientes com AIDS, a LTA geralmente se manifesta de forma mais grave, com lesões cutâneo-mucosas na maior parte dos casos, ou mesmo com lesões disseminadas (MS 2011). O tratamento das duas doenças de maneira concomitante pode ser bastante lesivo aos pacientes, visto os efeitos adversos que as medicações para estas doenças possuem de maneira isolada, e que podem ainda ser potencializados ou mesmo agravados por interações medicamentosas.

Outra manifestação clínica que ganhou importância após o início da terapia antirretroviral (TARV) foi a Síndrome Inflamatória de Reconstituição Imune (IRIS), com o surgimento de lesões de leishmaniose em pacientes que aparentemente estão em franca recuperação de seu sistema imunológico pela ação dos antirretrovirais (Posada-Vergara et al. 2005, Chrusciak-Talhari et al. 2009).

Estimar a frequência em que a coinfeção leishmaniose tegumentar/AIDS ocorre pode ser de grande importância para uma melhor compreensão da dinâmica desta associação, e pode ainda colaborar para melhores estratégias de prevenção e tratamento.

O objetivo deste relato foi quantificar a prevalência da co-infecção leishmaniose tegumentar/AIDS no RJ. Avaliamos também as características das manifestações clínicas da LTA nesta associação, no que diz respeito à gravidade, possível

surgimento de recidivas ou evolução para a forma de leishmaniose mucosa (LM) com ou sem uso de terapia antirretroviral.

Foi solicitada uma autorização para acesso aos bancos de dados dos sistemas de registro do Ministério da Saúde (SES-RJ/SVS/SVEA/ASINFO/SINAN) para “LTA” e “AIDS” para detecção de casos de co-infecção no RJ. O Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), só passou a ser compulsório a partir de 1998. Na ficha de notificação de “LTA”, o campo específico para “HIV” foi introduzido apenas a partir do ano de 2007, e não é de preenchimento obrigatório. A notificação de pacientes apenas como portadores do vírus “HIV” (HIV⁺) não é compulsória, e esta obrigatoriedade só está prevista para entrar em vigor a partir de 2014.

Após o cruzamento de dados e detecção dos pacientes coinfectados, realizamos uma revisão nos prontuários para avaliação das características clínicas destes indivíduos, no que diz respeito à LTA e AIDS.

Foi realizado o cruzamento de dados entre os registros dos 2346 casos de LTA e dos 52.662 casos de AIDS encontrados no sistema de notificações do SINAN para o RJ entre os anos de 1998 e 2010.

Deste cruzamento, cinco pacientes foram notificados como casos de “LTA” e como casos de “AIDS”. Destes cinco, três tiveram primeiro a notificação como “LTA” e posteriormente como “AIDS”, entre dois e três anos após a LTA. Os outros dois casos foram diagnosticados e notificados simultaneamente com as duas doenças.

Foram localizados outros três pacientes nas listas de notificação de LTA que eram HIV⁺. Esta detecção foi possível porque o campo para especificação do paciente como sendo portador do vírus “HIV” estava assinalado. Nenhum destes três pacientes foi notificado como “AIDS” até o ano de 2010.

Durante o processo de revisão de prontuários dos pacientes notificados nos registros do SINAN que foram atendidos no Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas (IPEC/Fiocruz/RJ), foram localizados mais dois pacientes com a associação LTA-HIV/AIDS com falhas em suas notificações no sistema do SINAN.

Um destes pacientes teve a notificação de “LTA” em 2005, e já era portador do vírus HIV desde 1997. Este paciente teve o diagnóstico de AIDS apenas em 2007, quando iniciou a TARV. No entanto, seu nome não consta nos registros do SINAN de notificação de “AIDS”. O outro paciente com falha no sistema de notificações do SINAN estava notificado como “AIDS”, mas não possuía a notificação como “LTA”, que foi diagnosticada em 2006.

Em resumo, agregamos dez pacientes neste estudo: cinco notificados como “LTA” e “AIDS”, três notificados como “LTA” e com o diagnóstico de HIV⁺ assinalado na ficha de notificação de LTA, e dois casos onde foi detectada a falha no serviço de notificação do SINAN.

Em termos clínicos, cinco pacientes (50%) apresentavam lesões mucosas, dois (20%) eram portadores de lesões disseminadas, dois casos (20%) eram de lesões cutâneas, e em um caso a forma clínica não foi identificada na notificação.

Tivemos acesso ao prontuário de cinco pacientes. Não foi possível acessar o prontuário de outros dois casos. Os três restantes já tinham ido a óbito, sendo que um deles teve como causa da morte a leishmaniose disseminada no curso do HIV/AIDS.

Nos cinco casos onde os prontuários foram analisados, quatro eram pacientes com LM e um com lesões disseminadas pela pele. Recidivas foram detectadas em três pacientes de LM. Destes, dois pacientes não tinham história de uso de TARV. Um deles apresentou recidiva oito meses após o tratamento inicial, e o outro recidivou após dois meses depois fim da terapia para LTA. O terceiro paciente apresentou recidiva um ano e cinco meses após o tratamento da LTA e três meses após ter iniciado o uso de TARV. Para este paciente, mesmo estando sob terapia antirretroviral, a cura para LTA foi alcançada.

A epidemia de AIDS e a sobreposição com as áreas endêmicas de leishmaniose trouxeram novos aspectos imunopatológicos para a LTA. Os dados aqui obtidos indicam uma baixa frequência de associação LTA-HIV/AIDS no RJ, com apenas sete casos detectados. Outros três casos de coinfeção também foram localizados, num total de dez casos.

Detectou-se pelo menos duas falhas no SINAN, não sendo possível determinar se estas falhas ocorreram ao nível municipal ou estadual.

Apesar da aparente baixa frequência da coinfeção LTA-HIV/AIDS, com apenas dez casos localizados dentre os 2346 casos de LTA notificados no período estudado, 80% dos casos eram de formas graves, como LM e leishmaniose disseminada pela pele, confirmando o que já foi evidenciado por outros autores (Machado et al 1992, Mattos et al 1998, Amato et al 2000, Lindoso et al, 2009). Este fato ratifica que a LTA pode ter maior gravidade de apresentação nestes indivíduos, inclusive sendo a leishmaniose a responsável pelo óbito de um deles. Logo, deve-se ficar atento tanto ao tratamento de pacientes HIV⁺ quanto ao de pacientes com AIDS, para diagnosticar precocemente possíveis casos de LTA.

A detecção de falhas no sistema de notificações do MS alerta para a possibilidade de que o número de coinfeções LTA-HIV/AIDS poder ser maior do que o aqui observado. Devemos ainda ressaltar a importância de se estar atento para a correta notificação dos casos.

A expectativa é que, a partir do ano de 2014, quando entrar em vigor a obrigatoriedade de notificação de indivíduos como “HIV⁺” estas falhas sejam minimizadas.

Referências

- Aguiar GM, Medeiros WM, Santos TG 1993. Ecology of sandflies in a recent focus of cutaneous leishmaniasis in Paraty, litoral of Rio de Janeiro State (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 339-340.
- Aguiar GM, Vilela ML. & Lima, RB 1987. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 583-584.
- Almeida OLS, Santos JB 2011. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the world last ten years: a systematic literature review. *An Bras Dermatol* 86: 497-506.
- Alvar J, Ve Les ID, Bern C, Herreo M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One* 7 e35671, 1-12.
- Amato VS, Nicodemo AC, Amato JG, Boulos M, Amato Neto V 2000. Mucocutaneous leishmaniasis associated with HIV infection treated successfully with liposomal amphotericin B (AmBiosome). *J Antimicrob Chemotherapy* 46: 341-342.
- Aragão, HB 1927. Leishmaniose tegumentar Americana e sua transmissão pelos phlebótomos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 20: 177-187.
- Araujo-Filho NA 1978. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar Americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro. Tese de mestrado do curso de Pós-graduação em Doenças Infectoparasitárias da UFRJ.
- Azeredo-Coutinho RB, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, Pacheco RS, Valete-Rosalino CM, Mendonça SC 2007. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101:735-737.
- Azeredo-Coutinho RB, Mendonça SCF 2002. An intermittent schedule is better than continuous regimen of antimonial therapy for cutaneous leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 477-481.
- Azulay RD 1952. Leishmaniose tegumentar. Tese de Livre-Docência. Faculdade de Ciências Médicas do Distrito Federal. 1-168
- Barbosa GM, Marzochi MC, Massard CL, Lima GP, Confort EM 1999. Epidemiological aspects of canine American tegumentar leishmaniasis in the

municipality of Paraty, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica* 15: 641-646.

Barbosa GMS 2001. Aspectos epidemiológicos descritivos da leishmaniose tegumentar americana em duas aldeias indígenas Guarani em Paraty, litoral sul fluminense. (Tese de doutorado do curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária e Parasitologia Veterinária do Instituto de Biologia da UFRRJ).

Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM 2007. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 625-30.

Brazil RP, Pontes MC, Passos WL, Rodrigues AA, Brazil BG 2011. The sand fly fauna (Psychodidae: Phlebotominae) in the region of Saquarema, State of Rio de Janeiro, Brazil, an endemic area of cutaneous leishmaniasis transmission. *J Vector Ecol* 36 Suppl 1:S95-8.

Carnauba Jr D, Konishi CT, Petri V, Martinez ICP, Shimizu L, Pereira-Chiocola VL 2009. Atypical disseminated leishmaniasis similar to post-kala-azar dermal leishmaniasis in a Brazilian AIDS patient infected with *Leishmanis (Leishmania) infantum chagasi*: a case report. *Int J Infect Dis* 13: 504-507.

Carvalho AM, Magalhães A, Carvalho LP, Bacellar O, Scott P, carvalho EM 2013. Immunologic response and memory T cells in subjects cured of tegumentar leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 13: 529.

Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S, Rocha H 1985. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol* 135: 4144-4148.

Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S, Rocha H 1994. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 56: 315-325.

Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, Magalhaes A, Guimaraes LH, Lessa M, Ribeiro S, Reale J, Noronha EF, Wilson ME, Duggal P, Beaty TH, Jeronimo S, Jamieson SE, Bales A, Blackwell JM, de Jesus AR, Carvalho EM 2006. IL-6 – 174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis* 194: 519-527.

- Cella W, Melo SCCS, DellAgnolo CM, Pelloso SM, Silveira TGV, Carvalho MDB. 2012. Seventeen years of American cutaneous leishmaniasis in a southern Brazilian municipality. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 54: 215-218.
- Cerqueira, AC & Vasconcellos A 1922. A leishmaniose nesta capital. *Bol San Rio de Janeiro* 1: 35-47.
- Chrusciak-Talhari, A, Ribeiro-Rodrigues R, Talhari C, Silva Jn RM, Ferreira LCL, Botileiro SFC, Santos LO, Dietze R, Talhari S 2009. Case report: tegumentar leishmaniasis as the cause of Immune reconstitution Inflammatory Syndrome in a patient co-infected with Human Immunodeficiency Virus and *Leishmania guyanensis*. *Am J Med Hyg* 81: 550-564.
- Costa JM, Netto EM, Vale KC, Osaki NK, Tada MS, Marsden PD 1987. Spontaneous healing of cutaneous *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 606.
- Coura JR, Galvão-Castro B, Grimaldi Jr G 1987. Disseminated American cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 581-582
- Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MCA, Tramontano N 1985. A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 80: 17-22.
- Coutinho SG, Pirmez C, Mendonça SCF, Conceição-Silva F, Dórea RCC 1987. Pathogenesis and immunopathogenesis of leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 214-228.
- Chrusciak-Talhari A, Dietz R, Chrusciak-Talhari C 2011. Randomized controlled clinical Trial to Assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guayanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 84: 255-260.
- Da-Cruz AM, Filgueiras DV, Coutinho Z, Mayrink W, Grimaldi G Jr, De-Luca PM, Mendonça SC, Coutinho SG 1999. Atypical mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in an acquired immunodeficiency syndrome patient: T-cell responses and remission of lesions associated with antigen immunotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 537-542.
- Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG 2002. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 251-256.

- Da-Cruz AM, Bertho AL, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG 2005. Flow cytometry analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis. *Clin Lab Invest* 153: 537-543.
- Da-Cruz AM, Machado ES, Menezes JA, Rutowitsch MS, Coutinho SG 1992. Cellular and humoral immune responses of a patient with American cutaneous leishmaniasis and AIDS. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 511-512.
- Da-Cruz AM, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho Z, Machado ES, Coutinho SG 2000. Cellular immune responses to *Leishmania braziliensis* in patients with AIDS-associated American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 569-571.
- Da-Cruz AM, Pirmez C 2013. Leishmaniose tegumentar americana. In JR Coura, *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ 2012. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 67: 2576-2597.
- Dorval MEMC, Oshiro ET, Cupollilo E, Castro AC, Alves TP 2006. Occurrence of American tegumentary leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 43-46.
- D'utra & Silva, O 1914. Leishmaniose. *Bol Soc Bras Dermat* 3: 39-40.
- D'utra & Silva O 1915. Sobre a leishmaniose tegumentar e seu tratamento. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 7: 213-248.
- Faghihi G, Tavakoli-kia R 2003. Treatment of cutaneous leishmaniasis with either topical paromomycin or intralesional meglumine antimoniate. *Clin Exp Dermatol* 28:13-6.
- Fagundes-Silva GA, Vieira-Goncalves R, Nepomuceno MP, Souza MA, Favoreto Jr S, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, Gomes-Silva A 2012. Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunol* 34: 486-491.
- González U, Pinart M, Reveiz L, Rengifo-Pardo M, Tweed J, Macaya A, Alvar J 2010. Designing and reporting clinical trials on treatments for cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 51: 409-419.
- Gomes-Silva A, Bittar R, Nogueira R, Amato VS, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM 2007. Can interferon-gamma and interleukin-10

- balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol* 149: 440-444.
- Gomes-Silva A, Souza MA, Afonso-Cardose SR, Andrade LR, Dietze R, Lemos E, Belli A, Favoreto Junior S, Ferreira MS 2008. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 135-141.
- Grimaldi Jr G & Mc-Mahon-Pratt D 1991. Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: an overview. *Prog Clin Parasitol* 2: 73-118.
- Guimarães LH, Machado PR, Lago EL, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Carvalho EM 2009. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 712-715.
- Guerra JAO, Coelho LIRC, Pereira FR, Siqueira AM, Ribeiro RL, Almeida AML, Lacerda VG, Barbosa MG, Talhari S 2011. American tegumentary leishmaniasis and HIV-AIDS association in a tertiary care center in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 85: 524-527.
- Jin JO, Han X, Yu Q 2013. Interleukin-6 induces the generation of IL-10-producing Tr1 cells and suppresses autoimmune tissue inflammation. *J Autoimmun* 1: 1-27.
- Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, Carvalho EM 2012. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg* 86: 426-433.
- Kim DH, Chun HJ, Bleyers J, Ghohostani RF 2009. Is paramomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? A meta-analysis of 14 randomized trials. *Plos Neglect Dis* 3: 1-10.
- Kawa H & Sabroza PC 2002. Especialização da leishmaniose tegumentar na cidade do Rio de Janeiro. *Cad Saude Publica Rio de Janeiro* 18: 853-865.
- Kawa H, Sabroza PC, Oliveira RM, Barcellos C 2010. A produção do lugar de transmissão da leishmaniose tegumentar: o caso da localidade de Pau da Fome na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saude Publica* 26: 1495-1507.
- Lindoso JAL, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MIS, Oyafuso LK, Amato VS, Goto H 2009. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *British J Dermatol* 160: 311-318.

- Machado ES, Braga MP, Da-Cruz AM, Coutinho SG, Vieira ARM, Rutowitsch MS, Cuzzi-Maya T, Grimaldi Jr G, Menezes JA 1992. Disseminated American mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (braziliensis) braziliensis* in a patient with AIDS: a case report. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 487-492.
- Machado W 1913. Caso de leishmaniose. *Bol Soc Bras Dermatol* 2: 8ª Sessão Ordinária.
- Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH 2010. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *Plos Negl Trop Dis* 4: e912.
- Marinho J 1913. Leishmaniose. *Bol Soc Bras Dermatol* 2: 5ª Sessão Ordinária.
- Marinho J 1914. Leishmaniose da mucosa nasal. *Bol Soc Bras Dermat* 3: 52-53.
- Marzochi MCA, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E, Schubach AO, Marzochi KBF 2009. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 570-580.
- Mattos M, Caiza A, Fernandes O, Gonçalves AJS, Pirmez C, Souza CSF, Oliveira-Neto MP 1998. American cutaneous leishmaniasis associated with HIV infection: report of four cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 10: 218-225.
- Menezes, JA, Reis, VLL, Vasconcelos, JA 1974. Pequeno surto de leishmaniose tegumentar Americana em Macuco (Cordeiro-RJ). *Rev Soc Bras Med Trop* VIII: 143-151.
- MS/SVS. 2010. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana 2010. Acessado em dezembro de 2013. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf
- MS 2011. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*/HIV – Brasília.
- Nery-Guimarães F 1955. Estudo de um foco de leishmaniose mucocutânea na Baixada Fluminense (Estado do Rio de Janeiro). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 53: 1-11, 1955.

- Neves DBJ, Caldas ED, Sampaio RNR 2010. Antimony in plasma and skin of patients with cutaneous leishmaniasis – relationship with side effects after treatment with meglumine antimoniate. *Trop Med Int Health* 14: 1515-1522.
- Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, Andrade CA 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop* 118: 87-96.
- Oliveira-Camera P, Junger J, do Espírito Santo Silva Pires F, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Fernandes O, Pirmez C 2006. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100:1112-1117.
- Oliveira-Neto MP, Pirmez C, Rangel E, Schubach A, Grimaldi Jr G 1988. An outbreak of American tegumentary leishmaniasis (*Leishmania braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 427-435.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Araújo ML, Pirmez C 1996. High and low doses of antimony (Sbv) in American cutaneous leishmaniasis. A five years follow-up study of 15 patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 207-209.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, da Costa SC, Pirmez C 1997. Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil -an area of *Leishmania (V.) braziliensis* transmission. *Int J Dermatol* 36:463-468.
- Oliveira-Neto MP 1998. Leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. Estudo de 648 casos observados no Hospital Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, vii +166pp + 14 anexos.
- Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-Cruz AM, Fernandes O, Moreira J, Gonçalves-Costa SC, Brahin LR, Menezes CR, Pirmez 2000. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermatol* 39: 506-514.
- Oliveira-Neto MP, Mattos MS. 2006. An alternative antimonial schedule to be used in cutaneous leishmaniasis when high doses of antimony are undesirable. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 323-326.

- Oliveira SMP, Afonso RCH, Dias CMG, Brazil RP 1998. Estudo da fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Santa Cruz, município do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Entomol* 39: 547-551
- Olliaro P, Vaillant M, Arana B, Grogl M, Modabber F, Magill A, Lapujade O, Buffet P, Alvar J 2013. Methodology of clinical trials aimed at assessing interventions for cutaneous leishmaniasis. *Plos Neglect Trop Dis* 7: 1-19.
- OMS 2013 - Organização Mundial da Saúde. Acessado em dezembro de 2013.
Disponível em: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/
- Pereira-Carvalho R, Mendes-Aguiar CO, Oliveira-Neto MP, Covas CJ, Bertho AL, Da-Cruz AM, Gomes-Silva A 2013. *Leishmania braziliensis*-reactive T cells are down-regulated in long-term cured cutaneous leishmaniasis, but the renewal capacity of T effector memory compartments is preserved. *Plos One* 26;8:e81529
- Pirmez C, Coutinho SG, Marzochi MCA, Nunes MP, Grimaldi Jr G 1988. Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 38: 52-58.
- Pirmez C, Trajano VS, Oliveira-Neto MP 1999. Use of polimerase chain reaction in the diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 37: 1819- 1823.
- Posada-Vergara MP, Lindoso JA, Tolezano JE, Pereira-Chioccola VL, Silva MV, Goto H 2005. Tegumentary leishmaniasis as a manifestation of Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in 2 patients with AIDS. *J Infect Dis* 192: 1819-1822.
- Rabello E. 1913. *Bol Soc Bras Dermatol*, 2: 6a Sessão Ordinária.
- Rabello E 1913. Caso de leishmaniose. *Bol Soc Bras Dermatol* 2: 72-72.
- Rabello E 1925. Contribuições ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil. 1 – Histórico e Sinonimia. *An Bras Dermatol Syph* 1: 3-31.
- Revez L, Maia-Eikhoory AN, Nicholls RS, Romero GA, Yadon ZE 2013. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. *Plos One* 29;8: e61843.
- Rodrigues AA, Barbosa V de A, Andrade Filho JD, Brazil RP 2013. The sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 943-6.

- Rodrigues MZA, Grassi MFR, Metha S, Zhang X, Gois LL, Schooley RT, Badaro R 2011. Th1/Th2 cytokine profile in patients coinfecting with HIV and *Leishmania* in Brazil. *Clin Vaccine Immunol* 10: 1765-1769.
- Romero GA, Guerra MV, Paes GM, Macêdo VO 2001. 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.
- Rose-John S 2012. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sciences* 8: 1237-1247.
- Santiago MA, De Luca PM, Bertho AL, Azeredo-Coutinho RBG, Coutinho SG 2000. Detection of intracytoplasmatic cytokines by flow cytometry. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 401-402.
- Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM, Pires LH, Cupolillo E, Kuhls K, Giacoia-Gripp CB, Oliveira-Neto MP 2011. Atypical lesions as a sign of cutaneous dissemination of visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus-positive patient simultaneously infected by two viscerotropic *Leishmania* species. *Am J Trop Med Hyg* 85: 55-59.
- Santos OD, Coutinho CER, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC 2008. Leishmaniasis treatment – a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* 103: 1-10.
- Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE 2009. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31:423-431.
- Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, Luz M, Gutierrez P, Arboleda M, Berman JD, Junge K, Engel J, Sindermann H 2004. Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 38: 1266-1272.
- SINAN 2014 – Ministério da Saúde. Acessado em janeiro de 2014. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>
- SVS 2010 - Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Acessado em agosto de 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual2_Ita_2ed.pdf
- SVS 2012 - Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da saúde. Acessado em julho de 2012. disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_casos_de_Ita_entre_1990_e_2011.pdf

- Souza WJS, Sabrosa PC, Santos CS, Sousa E, Henrique MF, Coutinho SG 1992. Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. *Acta Tropica* 52:111-119.
- Terra F. Forma rara de leishmaniose. 1913. *Bol Soc Bras Dermatol* 2: 6ª Sessão Ordinária.
- Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Nakamura CV 2011. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis* 15: 525-532.
- Tuon FF, Gomes-Silva A, Da-Cruz AM, Duarte MIS, Amato Neto V, Amato VS 2008. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. *Clin Immunol* 128: 442-446.
- Turetz ML, Machado PR, Al Ko, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM 2002. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis* 186: 1829-1834.
- Vale ECS & Furtado T 2005. Leishmaniose tegumentar Americana: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *Ann Bras Dermatol* 80:421-428.
- Vasconcellos ECF, Schubach AO, Valette-Rosalindo CM, Coutinho SR, Conceição-Silva F, Salgueiro MM, Rosandisnsk ML, Soares JM, Azeredo-Coutinho RB, Pimental MLF, Mortari RS, Madeira FM, Quintella LP, Baptista C, Marzochi MCA 2010. American tegumentary leishmaniasis in older adults: 44 cases treated with an intermittent low-dose antimonial schedule in Rio de Janeiro, Brazil. *J Am Geriatr Soc* 58: 614-616.
- Vasconcellos ECF, Pimentel MIF, Schubach AO, Oliveira RVC, Azeredo-Coutinho RB, Conceição-Silva F, Salgueiro MM, Moreira JS, Madeira MF, Batista C, Valette-Rosalino CM 2012. Short report: intralesional meglumine antimoniate for treatment of cutaneous leishmaniasis patients with contraindication of systemic therapy from Rio de Janeiro (2000-2006). *Am J Trop Med Hyg*, 87: 257-260.
- Vianna G 1911. Sobre uma nova espécie de *Leishmania*. *Brazil-Medico*. 41.
- Vianna G 1913. Algumas formas de *Leishmania*. *Bol Soc Bras Dermatol* 2: 9ª Sessão Ordinária.

Vieira-Gonçalves R, Pirmez C, Jorge ME, Souza WJ, Oliveira MP, Rutowitsch MS, Da-Cruz AM 2008. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *Int J Dermatol* 47:926-32.