

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

Thalita Gagini Braga

COMPARAÇÃO DA HETEROGENEIDADE GENÉTICA E DA
SENSIBILIDADE *IN VITRO* AO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA
ENTRE AMOSTRAS DE *Leishmania braziliensis* ISOLADAS DE
PACIENTES RESPONDEDORES E NÃO RESPONDEDORES AO
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Rio de Janeiro

2012

COMPARAÇÃO DA HETEROGENEIDADE GENÉTICA E DA
SENSIBILIDADE *IN VITRO* AO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA
ENTRE AMOSTRAS DE *Leishmania braziliensis* ISOLADAS DE
PACIENTES RESPONDEDORES E NÃO RESPONDEDORES AO
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Thalita Gagini Braga

Tese apresentada ao Curso de
Pós Graduação em Pesquisa
Clínica em Doenças
Infecciosas do Instituto de
Pesquisa Clínica Evandro
Chagas para obtenção do
título de Doutor em Ciências
da Saúde.

Orientadores: Dr. Armando de
Oliveira Schubach e Dra.
Maria de Fátima Madeira

Rio de Janeiro

2012

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

B813

Braga, Thalita Gagini

Comparação da heterogeneidade genética e da sensibilidade *in vitro* ao antimoniato de meglumina entre amostras de *Leishmania braziliensis* isoladas de pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento da Leishmaniose cutânea/ Thalita Gagini Braga. – Rio de Janeiro, 2012. xvi, 92f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2012.
Bibliografia: f. 66-83

1. Antimoniato de Meglumina 2. *Leishmania braziliensis*. 3. Terapia.
4. LSSP-PCR. 5. Teste intradérmico. I. Título.

CDD 614.534

Thalita Gagini Braga

COMPARAÇÃO DA HETEROGENEIDADE GENÉTICA E DA
SENSIBILIDADE *IN VITRO* AO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA
ENTRE AMOSTRAS DE *Leishmania braziliensis* ISOLADAS DE
PACIENTES RESPONDEDORES E NÃO RESPONDEDORES AO
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Tese apresentada ao Curso de
Pós Graduação em Pesquisa
Clínica em Doenças
Infecciosas do Instituto de
Pesquisa Clínica Evandro
Chagas para obtenção do
título de Doutor em Ciências
da Saúde.

Orientador: Dr. Armando de
Oliveira Schubach e Dra.
Maria de Fátima Madeira

Aprovada em: 22 / 10 / 2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Claudia Maria Valete Rosalino

Profa. Dra. Maria Inês Fernandes Pimentel

Profa. Dra. Aline Fagundes da Silva

Profa. Dra. Fernanda Santos Oliveira

Profa. Dra. Flavia Coelho Ribeiro

Dedico este trabalho tão desejado e aguardado aos meus pais - Marli e Manoel - pois sem a participação e incentivo constante deles eu teria deixado este sonho para trás. A vocês todo meu amor e gratidão.

Agradecimentos

Sei que corro o risco de não dar conta desses ‘muitíssimo obrigado’ como é merecido, porque será difícil exprimir a gratidão que sinto pela beleza que foi esse movimento de energias e impulsos que foram chegando. Por tudo isso se destaca também, para além da mera formalidade, um sentido: o da formação de uma verdadeira rede de solidariedade e de muita consideração.

Para maior percepção desse sentido devo contar que esta não foi uma caminhada breve, mas uma travessia que parecia sem fim, principalmente pelas intercorrências pessoais de toda ordem que me atropelaram. Esses percalços inicialmente me distanciaram, mas longe de obscurecerem o trajeto, aumentaram-lhe o brilho. E, ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força.

Se o desafio era enorme, as motivações eram grandiosas, somadas às espontâneas generosidades que fizeram possível a transformação de momentos de angústia e sofrimento em uma estrada larga, margeada de flores, frutos e frondosas árvores! Uma estrada toda verde – repleta de cheiros, cores, e sons – cujo nome é esperança e cuja base é a busca de saberes.

Embora uma tese seja, pela sua finalidade acadêmica, um trabalho individual, houve contribuições de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçadas. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente a Deus, por todas as dádivas com as quais me presenteou, por colocar na minha vida tantas pessoas que me apoiaram e ajudaram nos momentos mais tortuosos do caminho.

Agradecimentos especiais a minha família, principalmente aos meus pais, por tudo que representam, por todo esforço de uma vida dedicada a minha educação e formação. Se não fosse por eles, eu nada seria.

Ao Dr. Armando de Oliveira Schubach, meu orientador, por ter confiado em mim em momentos que mais ninguém o faria. Por me abrir os olhos para a importância do que eu estava jogando fora. Obrigada por todos os ensinamentos que vou levar por toda minha vida.

A Dra. Maria de Fátima Madeira, por abrir as portas do seu laboratório para mim, por toda compreensão, paciência e incentivo. Por estar ao meu lado e me conduzir em todas as etapas desse trabalho, me inserindo na sua equipe.

A toda equipe do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do

IPEC/FIOCRUZ, pela acolhida, respeito, cooperação e incentivo à realização deste trabalho. Agradeço especialmente a Luciana de Freitas Campos Miranda, por toda ajuda na adaptação ao novo ambiente de trabalho, na realização das técnicas e pelas conversas de incentivo. A Jamyra Iglesias Cataldo, pelo preparo das massas para realização das PCRs. E ao Eduardo da Silva Machado, pela realização dos ensaios de isoenzimas, pela ajuda em diversas atividades e por me fazer rir, quando eu já estava me esquecendo desta sensação. Mesmo aqueles que não estavam diretamente relacionados ao projeto tiveram participação fundamental na realização deste, muito obrigada!

A equipe do laboratório de Sistemática e Bioquímica de Tripanossomatídeos do IOC. Agradeço a Fernanda Santos Oliveira e Marize Quinhones Pires pelos ensinamentos e toda ajuda na realização dos PCRs. A Dra. Raquel da Silva Pacheco por dar suporte na orientação da parte molecular da tese e análise dos resultados. A Vilma, Jéssica e Camila pela companhia.

A equipe do Ambulatório de Leishmanioses do IPEC, que mesmo não tendo atuado diretamente neste trabalho, me ajudou e atendeu sempre com muito carinho.

A todos os amigos de turma da Pós- Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas, pelo carinho, cumplicidade e maravilhosa convivência. Lembro com carinho especial das amigas que fiz aqui e vou levar por toda minha vida: Maíra Holanda, Regiane Trigueiro, Luciana Casartelli, Regina Carvalho, Jenif Braga, Marcelle França, Rafaela Veiga, Virginia Araújo e Amanda Ribeiro. Amo vocês!

A coordenação do Curso de Pós- Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas e Parasitárias do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ, principalmente a Priscilla Tavares e ao Marcelo Eduardo Timóteo.

Peço desculpas se neste momento não fiz referência a alguma das pessoas que tanto colaboraram para realização deste trabalho, mas tenham certeza que, mesmo não tendo sido citados, com certeza vocês nunca serão esquecidos.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

(Chico Xavier)

Gagini, TB. **Comparação da heterogeneidade genética e da sensibilidade *in vitro* ao antimoniato de meglumina entre amostras de *Leishmania braziliensis* isoladas de pacientes Respondedores e Não Respondedores ao tratamento da leishmaniose cutânea.** Rio de Janeiro, 2012. 93 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz.

RESUMO

Pacientes com leishmaniose cutânea (LC) apresentam variada resposta à terapêutica com antimoniais pentavalentes, desde a cura clínica até a falha terapêutica e reativação da doença. Aspectos relacionados ao hospedeiro, aos parasitos, aos diferentes fármacos e aos diferentes esquemas terapêuticos podem influenciar nesse desfecho. No estado do Rio de Janeiro, tem sido relatada resposta terapêutica favorável a baixas doses de antimoniais (5mg Sb^V/kg/dia). É possível que esse resultado esteja relacionado a características genéticas das subpopulações de *Leishmania braziliensis* que circulam nesse Estado. Neste estudo investigou-se a variabilidade genética e a sensibilidade *in vitro* ao antimoniato de meglumina de amostras de *L. braziliensis*, comparando isolados obtidos de pacientes com LC respondedores ou não respondedores ao tratamento com 5mg Sb^V/Kg/dia. Foram estudadas amostras de pacientes diagnosticados no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (Vigileish) do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fundação Oswaldo Cruz entre 1999 e 2011. Utilizamos uma amostra de conveniência compreendendo 54 isolados recuperados do banco de cepas do Vigileish, as quais foram distribuídas em quatro subgrupos obedecendo a critérios de inclusão: R_{RJ}) Respondedores ao primeiro curso de tratamento, com infecção adquirida no estado do Rio de Janeiro; NR_{RJ}) Não respondedores ao primeiro curso de tratamento, com infecção no estado do Rio de Janeiro; R_{OE}) Respondedores ao tratamento, com infecção adquirida em outros estados brasileiros e NR_{OE}) Não respondedores, com infecção em outros estados brasileiros. A metodologia utilizada compreendeu inicialmente a caracterização das amostras pela técnica de isoenzimas e após, avaliação da sensibilidade ao antimoniato de meglumina por diluição limitante (DL₅₀) utilizando formas promastigotas e análise da variabilidade genética por Low-Stringency Single-Specific-Primer (LSSP-PCR). Dados clínicos e laboratoriais relacionados ao diagnóstico dos pacientes e aos resultados obtidos neste estudo foram analisados estatisticamente por cálculos em Excel e usando o programa GraphPadPrism 5.0. Os níveis da dose letal de 50% (DL₅₀) das amostras variaram, respectivamente, de 1.9 a 6.0 mg/mL e de 2.3 a 6.4 mg/mL para pacientes respondedores ao tratamento e para pacientes não respondedores, e os valores médios para cada grupo apresentaram diferença significativa (p=0,0007). A diferença se manteve quando os grupos foram analisados separadamente por local de origem. Entretanto, não foi possível associar tal resultado a padrões genéticos dos parasitos estudados após análise dos dendrogramas gerados pela técnica de LSSP-PCR. Os valores médios da Intradermoreação de Montenegro (IDRM) foram significativamente maiores em pacientes respondedores (p= 0,0301). É possível que, no grupo estudado, fatores relacionados ao hospedeiro sejam mais importantes para variação da resposta terapêutica que os fatores genéticos do parasito e que o resultado da IDRM possa ser um indicativo de resposta terapêutica na LC.

Palavras-chave: 1. antimoniato de meglumina 2. *Leishmania braziliensis*. 3. Terapia 4. LSSP-PCR 5. Teste intradérmico

Gagini, TB. **Comparison of genetic heterogeneity and *in vitro* sensitivity to meglumine antimoniate among *Leishmania braziliensis* samples isolated from patients Responders and Unresponders to treatment of cutaneous leishmaniasis.** Rio de Janeiro, 2012. 93 f. Thesis [PhD in Clinical Research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz.

ABSTRACT

Patients with cutaneous leishmaniasis (CL) have varied response to the therapy with pentavalent antimonials, from clinical cure to therapeutic failure and reactivation of the disease. Aspects related to the host, to parasites, to different drugs and different therapeutic schemes can influence this outcome. In Rio de Janeiro State, good therapeutic response with low doses of antimonials (5 mg Sb^V/kg/day) has been reported. It is possible that this result is related to genetic characteristics of *Leishmania braziliensis* subpopulations circulating in that State. This study investigated the *in vitro* sensitivity of samples of *L. braziliensis* to meglumine antimoniate, as well as their genetic variability, comparing isolates obtained from CL responder patients or unresponders to treatment with 5 mg Sb^V/kg/day. These patients were diagnosed at the Leishmaniasis Surveillance Laboratory (Vigileish) at the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz, between 1999 and 2011, and parasite strains obtained from samples of their skin lesions were studied. We used a convenience sample comprising 54 isolated retrieved from the Vigileish archived strains, which were distributed in four subgroups according to the following inclusion criteria: R_{RJ}) Responders to the first course of treatment, with infection acquired in the State of Rio de Janeiro; NR_{RJ}) Unresponders to the first course of treatment, with infection in the State of Rio de Janeiro; R_{OE}) Responders to the treatment, with infection acquired in other Brazilian States and NR_{OE}) Unresponders, with infection in other Brazilian States. The methodology comprised initially the characterization of the samples by isozymes technique and after, assessment of sensitivity to meglumine antimoniate by limiting dilution using promastigote forms and analysis of genetic variability by Low-Stringency- Single-Specific Primer (LSSP-PCR). Clinical and laboratory data related to diagnosis of patients and the results obtained in this study were statistically analyzed through Excel calculations and using the program Graph Pad Prism 5.0. The levels of the 50% lethal dose (LD₅₀) of the samples varied from 1.9 to 6.0 mg/mL and from 2.3 to 6.4 mg/mL for Responder patients and for Unresponder patients, respectively, and the results for each group presented significant difference (p = 0.0007). The difference persisted when the groups were analyzed separately according to the origin location. However, it was not possible to associate this result to the parasites genetic patterns after analysis of dendrograms generated by the LSSP-PCR technique. The average values of Montenegro Skin Test (MST) were significantly higher in Responder patients (P = 0.0301). It is possible that, in the studied groups, host-related factors are more important for variation of therapeutic response than the parasite genetic factors, and the result of MST can be an indication of the therapeutic response in CL.

Keywords: 1. Meglumine antimoniate 2. *Leishmania braziliensis* 3. Therapy 4. LSSP-PCR 5. Skin tests

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	2
Figura 2	Principais medicamentos com ação leishmanicida.	9
Figura 3	Estrutura química do antimoniato de meglumina (Glucantime®).	11
Figura 4	Perfil da curva de crescimento de formas promastigostas de <i>Leishmania braziliensis</i> segundo Miranda, 2011.	26
Figura 5	Fluxograma com as etapas para seleção de amostras para o estudo.	33
Figura 6	Apresentação gráfica da dispersão dos valores da intradermorreação de Montenegro (IDRM) para os pacientes do grupo Respondedores e do grupo Não Respondedores.	40
Figura 7	Apresentação gráfica da dispersão dos valores da intradermorreação de Montenegro (IDRM). a: pacientes do subgrupo R _{RJ} e NR _{RJ} ; b: pacientes do subgrupo R _{OE} e NR _{OE} .	41
Figura 8	Apresentação gráfica da dispersão dos valores de número de lesões. a: pacientes do subgrupo R _{RJ} e NR _{RJ} ; b: pacientes do subgrupo R _{OE} e NR _{OE} .	42
Figura 9	Identificação gráfica dos valores da DL ₅₀ de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> de dez amostras representativas do grupo de pacientes Respondedores oriundos do estado do Rio de Janeiro, expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina, no intervalo de 24 horas.	44
Figura 10	Identificação gráfica dos valores da DL ₅₀ de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> de dez amostras representativas do grupo de pacientes Não Respondedores oriundos do estado do Rio de Janeiro, expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina, no intervalo de 24 horas.	45
Figura 11	Identificação gráfica dos valores da DL ₅₀ de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> das amostras do grupo de pacientes Respondedor, oriundos de outros estados, expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina, no intervalo de 24 horas.	46
Figura 12	Identificação gráfica dos valores da DL ₅₀ de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> das amostras do grupo de pacientes Não Respondedor oriundos de outros estados, expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina, no intervalo de 24 horas.	46
Figura 13	Apresentação gráfica da dispersão dos valores de DL ₅₀ comparando as amostras do grupo Respondedor e amostras do grupo Não Respondedor.	47
Figura 14	Apresentação gráfica da dispersão dos valores de DL ₅₀ comparando as amostras do subgrupo R _{RJ} e amostras do subgrupo NR _{RJ} (a) e amostras do subgrupo R _{OE} e amostras do subgrupo NR _{OE} (b).	48
Figura 15	Apresentação gráfica da dispersão dos valores de DL ₅₀ comparando as amostras de pacientes Respondedores do Rio de Janeiro e de outros estados (a) e amostras de pacientes Não Respondedores do Rio de	49

	Janeiro e de outros estados (b).	
Figura 16	Eletoforese em gel de agarose a 1,5% mostrando os produtos amplificados de amostras representativas do estudo, após a PCR com os iniciadores B1/B2. M: marcador molecular DNA Ladder 100 pb; Linhas de 2 a 10 no gel: amostras de pacientes.	50
Figura 17	Perfis gerados por LSSP-PCR mostrando a variabilidade genética de 10 amostras de <i>L. braziliensis</i> , representativas do estudo, considerando os grupos A e B.	51
Figura 18	Análise fenética utilizando-se o coeficiente de concordância simples (Simple Matching) e o algoritmo de UPGMA mostrando o agrupamento dos perfis de amplificação por LSSP-PCR em amostras de <i>L. braziliensis</i> isoladas de pacientes com diferentes desfechos após tratamento da LC com antimoniato de meglumina. Dois clusters (I e II) foram identificados.	52
Figura 19	Análise fenética utilizando-se o coeficiente de concordância simples (Simple Matching) e o algoritmo de UPGMA mostrando o agrupamento dos perfis de amplificação por LSSP-PCR em amostras de <i>L. braziliensis</i> isoladas de pacientes oriundos do estado do Rio de Janeiro, com diferentes desfechos após tratamento da LC com antimoniato de meglumina.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Soluções tampão utilizadas na preparação dos géis e nas corridas eletroforéticas.	23
Tabela 2	Solução corante utilizada na corrida eletroforética de isoenzimas.	24
Tabela 3	Protocolos utilizados no processo de revelação das enzimas estudadas, indicando substratos, coenzimas, ativadores, enzimas de ligação específica para cada sistema enzimático e os métodos de visualização empregados.	25
Tabela 4	Dados dos pacientes incluídos no estudo.	35
Tabela 5	Dados gerais do grupo Respondedores, composto por 26 pacientes que apresentaram boa resposta ao tratamento da LC com doses 5mg Sb ^v /kg/dia de antimoniato de meglumina.	36-37
Tabela 6	Dados gerais do grupo Não Respondedores, composto por 28 pacientes que apresentaram falha terapêutica ao tratamento da LC com baixas doses de antimoniato de meglumina (5mg Sb ^v /kg/dia)	38-39
Tabela 7	Valores da DL ₅₀ (mg/mL) obtido em ensaios <i>in vitro</i> para formas promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i> após exposição à diferentes concentrações de antimoniato de meglumina, considerando amostras isoladas de pacientes Respondedores (subgrupos R _{RJ} e R _{OE}) e Não Respondedores (subgrupos NR _{RJ} e NR _{OE}) ao tratamento da LC com 5mg Sb ^v /kg/dia.	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Esquema terapêutico preconizado para as diversas formas clínicas de LTA segundo OMS e Ministério da Saúde.	11
-----------------	--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
BHI	“Brain Heart Infusion” - Infusão cérebro coração
BSA	“Bovine serum albumin” - Albumina sérico bovina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLIOC	Coleção de Leishmânias do Instituto Oswaldo Cruz
DL ₅₀	(Dose Letal) Dose letal capaz de matar 50% da população estudada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleosídeos trifosfatos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” - Ensaio imunoenzimático
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
gp63	glicoproteína gp63
GPI	Fosfogluose isomerase
G6PD	glucose-6-fosfatase desidrogenase
6PGDH	6-fosfogluconato desidrogenase
HCL	Ácido clorídrico
HIV	“Human Immunodeficiency Virus”- Vírus da Imunodeficiência Humana
IC ₅₀	“Inibitory Concentration”- Concentração inibitória de 50%
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
kDNA	DNA do cinetoplasto
Kb	kilobases
LASIBI	Laboratório de Sistemática e Bioquímica
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCM	Leishmaniose cutâneomucosa
LM	Leishmaniose mucosa
LPG	“Lipophosphoglycan” - Lipofosfoglicano
LSSP-PCR	“Low Stringency Single Specific Primer” - Reação em Cadeia da Polimerase com Primer Único em Condições de Baixa Estringência
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
M	Molar
MDH	Malato desidrogenase
ME	Enzima málica
mL	mililitro
MLEE	“Multi-locus enzyme electrophoresis” - Eletroforese de Multilocus Enzimáticos
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
Mmol	milimolar
µL	microlitro
µmol	micromolar
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium bromide

N ₂	Nitrogênio líquido
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	Fosfato de sódio hidratado
NaH ₂ PO ₄	Diidrogeno fosfato de sódio
ng	nanograma
nDNA	DNA nuclear
NH	Nucleosideo hidrolase
NNN	Meio de Cultura Novy, Nicolle e McNeal
NR _{RJ}	Grupo de pacientes Não Respondedores ao tratamento com infecção no estado do Rio de Janeiro
NR _{OE}	Grupo de pacientes Não Respondedores ao tratamento com infecção em outros estados
pb	pares de bases
PBS	“Phosphate Buffered Saline” - Solução salina acrescida de fosfatos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGPA	Glicoproteína-P
PMS	Phenazine methosulfate
pH	Potencial de hidrogênio iônico
pmol	picomoles
R _{RJ}	Grupo de pacientes Respondedores ao tratamento com infecção no estado do Rio de Janeiro
R _{OE}	Grupo de pacientes Respondedores ao tratamento com infecção em outros estados
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism” - Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
rpm	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucléico
Sb ^v	Antimônio pentavalente
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
Taq	DNA polimerase termoestável derivada da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TBE	Tampão Tris, Ácido bórico e EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TR	Tripanotiona redutase
UPGMA	“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” - Método não Ponderado de Agrupamento aos Pares por Média
V	Volts
VigiLeish	Laboratório de Vigilância em Leishmanioses

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos gerais	1
1.2. Aspectos moleculares dos parasitos tripanosomatídeos.....	5
1.3. Terapêutica nas leishmanioses.....	8
1.4. Mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes	12
1.5. Definições relacionadas aos esquemas terapêuticos e critérios de cura utilizados pelo Ministério da Saúde Brasileiro (MS). Segundo Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana de 2010.....	15
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. Geral.....	18
3.2. Específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Delineamento do estudo	19
4.2. Sujeitos da Pesquisa e Amostras.....	19
4.2.1. Critérios de inclusão dos pacientes e amostras.....	20
4.2.2. Critérios de exclusão de pacientes e amostras	20
4.3. Etapas envolvendo a obtenção e manipulação das amostras de <i>Leishmania</i>	20
4.3.1. Isolamento e criopreservação das amostras	20
4.3.2. Recuperação das amostras do nitrogênio líquido	21
4.3.3. Preparo das massas parasitárias para a técnica de isoenzimas e PCR.....	22
4.4. Identificação das amostras através da eletroforese de isoenzimas - Multi-Locus Enzyme Electrophoresis (MLEE)	22
4.5. Ensaio de avaliação da sensibilidade ao antimoniato de meglumina	25
4.6. Análise da variabilidade genética de <i>Leishmania braziliensis</i> através de LSSP-PCR (Low-Stringency Single-Specific-Primer).....	27
4.6.1. Extração do DNA	27
4.6.2. Reação da PCR específica e da LSSP-PCR	29
4.7. Análises dos resultados e associações com dados dos pacientes	30
4.8. Aspectos éticos	31
5. RESULTADOS	32
5.1. Pacientes.....	32
5.2. Análise das amostras de <i>L. braziliensis</i>	42
5.2.1. Níveis de sensibilidade <i>in vitro</i> ao antimoniato de meglumina.....	42
5.2.2. Ensaio da PCR específica	49
5.2.3. Avaliação da heterogeneidade genética intrapopulacional de <i>L. braziliensis</i>	50
6. DISCUSSÃO	55
1. CONCLUSÕES.....	65
8. REFERÊNCIAS	66
9. ANEXOS	84
9.1. Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	84
9.2. Anexo 2 - Termo de Confidencialidade	91
9.3. Anexo 3- Parecer ético substanciado CEP.....	92

1. Introdução

1.1. Aspectos gerais

As leishmanioses constituem um grupo de doenças zoonóticas causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Clinicamente são classificadas em leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral e ocorrem em diferentes ambientes, sendo endêmicas em cerca de 88 países dos continentes americano, africano, asiático e europeu, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais (WHO, 2010). A classificação atual do gênero *Leishmania* segue o modelo taxonômico proposto por Lainson & Shaw (1987), que agrupa o gênero *Leishmania* nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*.

Até o momento, foram descritas 31 espécies de *Leishmania* infectando uma variedade de vetores e de mamíferos hospedeiros silvestres ou domésticos. Destas, 22 espécies são patogênicas e estão associadas à doença humana (Ashford et al., 2000; Silveira et al., 2002). Nas Américas, a leishmaniose tegumentar é conhecida como leishmaniose tegumentar americana (LTA). Apresenta padrões clínicos variados, relacionados à multiplicidade de espécies do parasito. No Brasil, são reconhecidas pelo menos sete espécies, das quais *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* são as mais prevalentes, enquanto *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) lindenbergi* são espécies mais raras que ocorrem na região norte do país (Ministério da Saúde, 2010). Cada espécie apresenta particularidades concernentes às manifestações clínicas, à distribuição geográfica e aos ciclos de transmissão, com diferentes vetores e reservatórios, o que provoca padrões epidemiológicos de elevada complexidade (Siviero do Vale & Furtado, 2005).

Os vetores de todas as formas das leishmanioses são dípteros da família Psychodidae, cujas fêmeas são hematófagas pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). No Brasil, são conhecidos popularmente como mosquito palha, birigui ou tatuquiras. São insetos de pequeno porte, com atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos, sombrios e bem protegidos dos ventos (Rath et al., 2003).

Os hospedeiros vertebrados de espécies dermatópicas, envolvidas com as manifestações tegumentares, são animais silvestres como roedores, gambá, tamanduá, tatu, canídeos, primatas e preguiça; e animais domésticos como cães, equídeos, além dos seres humanos.

As leishmânias são protozoários heteroxenos, que se reproduzem por divisão binária e apresentam em seu ciclo de vida duas formas evolutivas: a forma promastigota, flagelada e extracelular, encontrada no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado; e a forma amastigota, intracelular e sem movimentos, que parasita as células do sistema fagocítico-mononuclear dos hospedeiros vertebrados. As promastigotas apresentam corpo alongado e flagelo livre, medindo entre 14 e 20 μm . As amastigotas têm corpo ovóide e flagelo interno, medindo entre 2,1 e 3,2 μm (Rath et al., 2003).

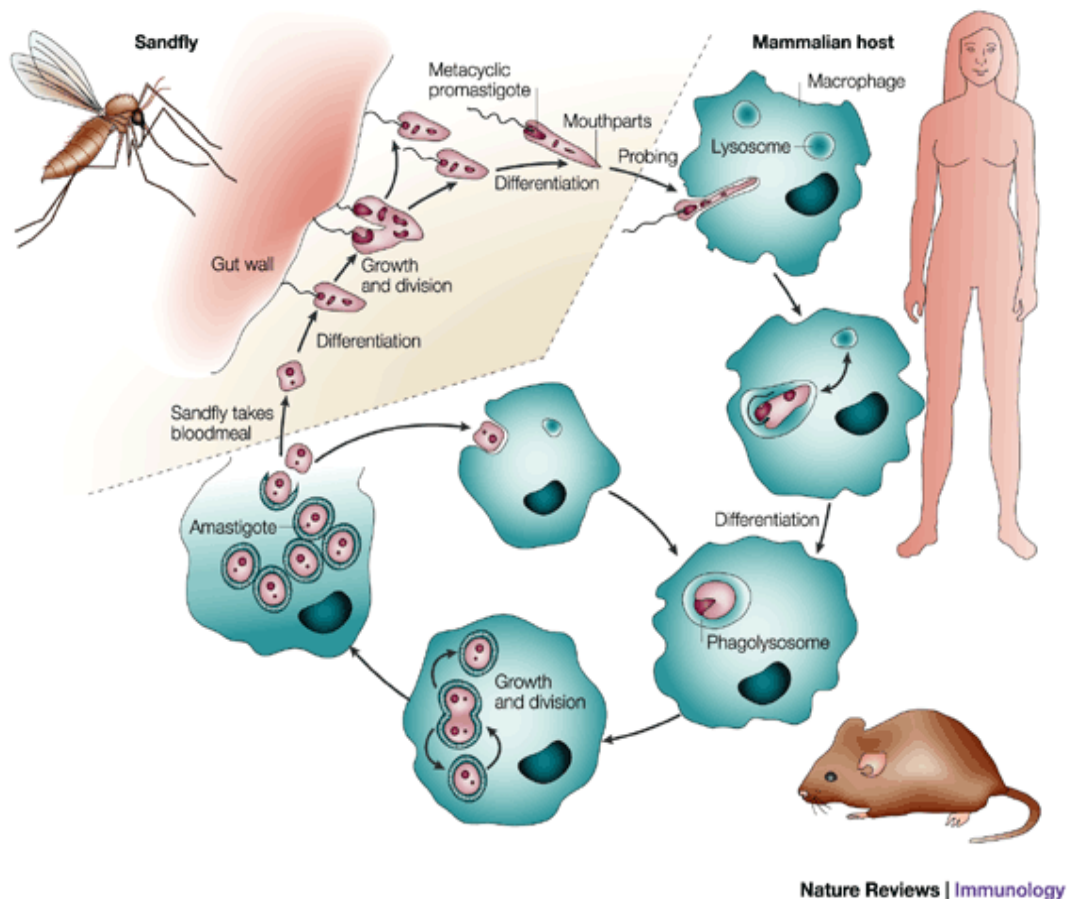


Figura 1- Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Adaptado de:
www.nature.com/.../v2/n11/fig_tab/nri933_F1.html

Formas promastigotas são introduzidas no organismo do hospedeiro vertebrado pela picada do flebotomíneo, durante o seu repasto sanguíneo. No organismo do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos da pele, essa fagocitose é induzida por receptores do sistema complemento, chamada de

opsonização, que é um dos mecanismos de escape das leishmânias. No interior da célula hospedeira, o parasito se diferencia para a forma amastigota multiplicando-se dentro do vacúolo parasitóforo e inibindo a atividade microbicida do macrófago. Segundo Castellano, isso se dá por meio da expressão de moléculas como a LPG e a gp63, que impedem a fusão do fagossomo com o lisossomo e a liberação de enzimas líticas (Figura 1). Tanto as formas promastigotas quanto as amastigotas são sensíveis aos antimoniais, sendo que promastigotas precisam de doses mais elevadas do fármaco. As formas amastigotas são difíceis de manter *in vitro*, sendo para isso necessária a implementação da cultura de células, uma técnica cara e de difícil controle. Por esta razão, diferentes autores optam por testar fármacos nas formas promastigotas, que são fáceis de obter e manter em laboratório, por um método barato e de fácil manutenção (Moreira ES, et al., 1995).

A adesão de *Leishmania* à membrana do macrófago é pré-requisito para sua fagocitose. Moléculas presentes na membrana desses parasitos, tais como glicoproteínas (gp) e glicolípídios são fundamentais neste processo, sendo a gp63 (gp63 ou PSP - “promastigote surface protease”) e o lipofosfoglicano (LPG) as principais moléculas ligantes (Handman & Goding 1985, Russell & Wilhelm, 1986). A pequena fração do inóculo infectante que consegue internalizar-se em macrófagos, a partir da ligação direta dessas moléculas com receptores de membrana das células, determina uma série de reações bioquímicas que podem levar à ativação ou à inibição das funções parasitizadas da célula hospedeira. A ativação caracteriza-se pela deflagração de processos oxidativos (sistema microbicida dependente de oxigênio) e produção de óxido nítrico (Georges et al., 1990).

À medida que ocorre o processo de fagocitose, os lisossomas das células fundem-se aos vacúolos parasitóforos formados, resultando em uma modificação do seu microambiente, que induz à transformação da forma promastigota para amastigota, que se multiplica, rompendo a célula infectada para invadir novos macrófagos e dar continuidade à infecção. Na forma amastigota, o parasito torna-se mais resistente e desencadeia menor resposta oxidativa da célula hospedeira (Antoine et al., 1990).

A ampla diversidade genética dos parasitos do gênero *Leishmania*, sobretudo *L. braziliensis*, que constitui a espécie de maior prevalência no Brasil, é conhecida (Pacheco et al., 1990, Cupolillo et al., 2003, Ishikawa et al., 2002). Tal diversidade pode estar relacionada ao genoma nuclear desses organismos, que mostram uma plasticidade inter e intra-espécies em termos de número e tamanho dos cromossomos (cariótipo

molecular) e, também no genoma mitocondrial, que pode variar, principalmente no tamanho e organização dos maxicírculos. Acredita-se que os diferentes padrões epidemiológicos possam também ter influência nos níveis de variabilidade. Amostras de *L. braziliensis* isoladas da região amazônica demonstraram elevada heterogeneidade genética, fato que foi relacionado ao grande número de espécie de vetores e animais que atuam nos ciclos de transmissão nessa região, ao contrário do que ocorre na Costa Atlântica do Brasil, onde as amostras estudadas indicaram um baixo nível de heterogeneidade (Cupolillo et al., 2003).

Do mesmo modo, os padrões epidemiológicos da LTA variam de acordo com as características da região geográfica, das espécies de *Leishmania* circulantes e do envolvimento dos vetores de diversas espécies do gênero *Lutzomyia* e reservatórios, como roedores silvestres, canídeos e felídeos. A prevalência da infecção humana também varia em função de diferentes padrões, já que tradicionalmente, a LTA era classificada como uma zoonose que acometia acidentalmente o homem, quando este entrava em contato com a floresta primária. Entretanto, ao longo dos anos, esse padrão foi sendo modificado, devido à multiplicidade de fatores que envolvem a cadeia epidemiológica de transmissão (Lainson et al., 1987).

Na LTA, as manifestações clínicas são de amplo espectro, fato que pode ser um reflexo da complexa interação entre a resposta imunológica do paciente e as características genéticas das espécies envolvidas na infecção (Ministério da Saúde, 2010). Devido à complexidade clínica, alguns autores sugerem a classificação da LTA em grupos e subgrupos; considerando diferentes abordagens, Marzochi & Marzochi (1994) classificaram a doença tegumentar sob duas formas, leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM), e respectivas apresentações clínicas.

O estabelecimento da infecção primária e o curso da doença dependem de inúmeros fatores, entre eles a espécie associada e o estado imunológico do indivíduo infectado. Dependendo da resposta imune mediada pelas células T, os indivíduos podem variar de um estado assintomático a diferentes graus de susceptibilidade à infecção. A forma cutânea localizada se encontra no centro deste espectro, e é mantida por uma resposta imune predominante do tipo Th1, que confere resistência contra a infecção e favorece os resultados do tratamento com antimonial, esse tipo de infecção apresenta em geral teste de IDR com grandes diâmetros, demonstrando que o paciente tem uma resposta imune ativada e pronta para atuar na infecção e células T diferenciadas. Nos pólos deste espectro estão a LM no pólo hiperérgico, que se caracteriza

imunologicamente pelo exagero das respostas celulares anti-*Leishmania* e pela escassez de parasitos, e a leishmaniose difusa no pólo anérgico, no qual a anergia celular está associada à acentuada proliferação dos parasitos e à disseminação da infecção (Silveira et al., 2008).

Devido às características imunobiológicas e ao grande espectro de manifestações clínicas apresentadas pela LTA, o seu diagnóstico nem sempre é uma tarefa fácil. Quando baseado somente em aspectos clínicos, o diagnóstico tem baixa exatidão, já que outras infecções assemelham-se a lesões de LTA (Luz et al., 2009). Dessa forma o diagnóstico deve, sempre que possível, estar apoiado nos exames laboratoriais, aspectos clínicos e evidências epidemiológicas.

A possibilidade da persistência parasitária após a cura clínica também é um fenômeno que tem sido estudado. Fatos como reativação espontânea das lesões, transmissão por transplante de órgãos, casos em pacientes imunodeprimidos (Da-Cruz et al., 1992) e encontro do parasito em lesões cicatrizadas por longos períodos (Schubach et al., 1998; Schubach et al., 2001) sugerem que a cura da LTA possa vir a decorrer do equilíbrio entre os parasitos e o hospedeiro. Os fatores que levam a evoluções diferentes (cura espontânea, persistência da lesão, recidivas, desenvolvimento da forma mucosa) ainda são um grande desafio para os pesquisadores.

1.2. Aspectos moleculares dos parasitos tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos estão classificados na ordem Kinetoplastida (Protozoa: Kinetoplastida) que engloba um grupo de protozoários com uma estrutura celular peculiar, o cinetoplasto, formado por uma complexa rede de Ácido desoxirribonucléico (DNA), contido numa mitocôndria única do protozoário, denominada DNA do cinetoplasto (kDNA). Essa estrutura localiza-se anteriormente ao cinetossoma do flagelo, perpendicularmente ao eixo maior do organismo e caracteriza os organismos da ordem Kinetoplastida (Simpson, 1987; Wirth, 1990).

Algumas espécies da família Trypanosomatidae são causadoras de doenças e, por essa razão, o conhecimento do genoma desses parasitos é importante em inúmeros aspectos. O kDNA é uma estrutura que possui cerca de 20% do DNA total da célula e está organizado em uma rede formada pela concatenação de milhares de molécula de DNA circulares que se assemelha a uma malha entrelaçada, sendo constituído por dois

tipos de moléculas circulares os maxicírculos e os minicírculos (Simpson & Berliner, 1974; Morel et al., 1980).

Os maxicírculos são minoritários, em torno de 5%, e contam com cerca de 20 a 40 kilobases (kb) dependendo da espécie. São formados por sequências homogêneas e estão presentes em quantidade de 20 a 50 cópias por rede, codificando os genes mitocondriais estruturais (Simpson & Berliner 1974; De-La Cruz, 1984). São homólogos funcionais do DNA mitocondrial de outros eucariotas e codificam Ácidos ribonucléicos (RNAs) ribossomais, alguns RNAs guias e proteínas envolvidas nos processos mitocondriais de transdução de energia. Os minicírculos são moléculas menores que constituem aproximadamente 95% do kDNA e se encontram na rede com cinco a dez mil cópias, na maioria das espécies de tripanosomatídeos. São heterogêneos em sequências e variam em tamanho de 0.5 kb a 2.5 kb entre as diferentes espécies de tripanosomatídeos mas não são intraespecificamente constantes (Shapiro & Englund, 1995).

Os minicírculos não são replicados enquanto estiverem ligados à rede. O mecanismo de replicação envolve a ação de uma topoisomerase II, que libera os minicírculos da rede sob a forma de moléculas circulares covalentemente fechadas que se deslocam para a periferia da rede onde se replicam e são novamente reincorporados à rede, que dobra de tamanho e segrega durante a divisão celular (Ryan & Englund, 1988; Fergusson et al., 1992; Sholomai, 1994). A função genética principal do minicírculo é a codificação dos pequenos RNAs guia que governam a especificidade da edição de RNA (Shapiro & Englund, 1995).

As regiões conservadas e variáveis nesses organismos variam em tamanho e em número de cópias e são encontradas nas moléculas de minicírculos. A sequência nucleotídica da região conservada é compartilhada intraespecificamente entre todos os minicírculos do kDNA enquanto a da região variável não é (Simpson, 1987; Shapiro, 1993; Morris et al., 2001). A região conservada está relacionada à replicação dos minicírculos e possui um tamanho aproximado de 120 a 200 pares de bases (pb) e quando presentes em número maior do que um, apresentam disposição simétrica ao longo da molécula. Na região conservada há uma sequência dodecâmera (GGGGTTGGTGTA), também conhecida como Sequência Universal dos Minicírculos, presentes nos minicírculos de kDNA de todos os tripanosomatídeos da ordem Kinetoplastida que representa a origem da replicação (Kidane et al., 1984; Ntambi & Englund, 1985; Ray, 1989; Morris et al., 2001).

A região variável apresenta uma heterogeneidade cuja origem é ainda obscura. A função codificante para RNAs guia fornece uma explicação para a heterogeneidade de sequência intra e entre espécies. Esta heterogeneidade sugere uma taxa de evolução elevada e difere entre as regiões variáveis e conservadas (Rogers & Wirth, 1987). As diferenças de sequências em classes de minicírculos têm sido utilizadas como marcadores para distinguir diferentes espécies e cepas, onde são utilizados na epidemiologia e no diagnóstico (Pacheco et al., 1995).

Nesse contexto, ferramentas moleculares para o conhecimento dessas regiões foram amplamente exploradas, sendo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variações utilizadas, permitindo desde a realização do diagnóstico etiológico até estudos de variabilidade genética. As análises podem ser feitas com base no tamanho do produto de amplificação, pelo perfil gerado por enzimas de restrição e também através do sequenciamento molecular desses produtos, cujas sequências podem ser comparadas com estudos prévios de outros parasitos, acessados publicamente.

Os minicírculos do kDNA foram os primeiros alvos moleculares a serem estudados em parasitos do gênero *Leishmania* pela técnica de PCR (Rodgers et al., 1990). Grupos de pesquisadores, analisando as regiões variáveis dessas moléculas, desenvolveram iniciadores, utilizados na PCR, que identificam as espécies responsáveis pelas leishmanioses tegumentares do Novo Mundo, ao nível dos subgêneros ou complexos. O fato de estar presente em múltiplas cópias e de ser composto por regiões conservadas e variáveis nos minicírculos fazem do kDNA moléculas alvo, excelentes para o diagnóstico da LTA (De Bruijn; Barker, 1992; Lopez et al., 1993; Eresh et al., 1994; Marcussi et al., 2008).

A técnica da reação em cadeia da polimerase com primer único em condições de baixa stringência (Low Stringency Single Specific Primer - LSSP-PCR), descrita por Pena e colaboradores em 1994, foi desenvolvida com a finalidade de detectar variação na sequência do DNA. A execução dessa metodologia, além de extremamente simples e rápida, é altamente sensível e informativa. Esta técnica é baseada nos mesmos princípios da PCR e consiste na reamplificação de um fragmento alvo de DNA (previamente amplificado) sob condições de baixa stringência, utilizando-se concentrações elevadas de DNA polimerase e apenas um dos iniciadores específicos para uma das extremidades do fragmento analisado. O produto da reação, ao ser analisado, produz um “fingerprint” do fragmento de DNA, o qual reflete a sequência da região analisada. Desta forma, a LSSP-PCR pode ser considerada como uma impressão digital do DNA, pois gera um

perfil de bandas típicas, focalizando o polimorfismo existente em um único segmento gênico (Pena et al., 1994).

O uso deste marcador molecular tendo como alvo o minicírculo de kDNA para discriminar diferentes variantes de parasitos diretamente de material clínico é uma ferramenta potencial para investigar assinaturas de kDNA das populações de parasitos. Como resultado, esta técnica produz perfis que refletem os polimorfismos de classes de minicírculos predominantes, e pode ser útil em estudos que visam discriminar genótipos de espécies de *Leishmania* (Ferreira et al., 2007; Baptista et al., 2009).

Vale ressaltar que a PCR, além de grande contribuição para o diagnóstico, também apóia investigações em outros campos, relacionados principalmente ao fenômeno da persistência parasitária e a disseminação hemática e linfática desses parasitos. Alguns estudos detectaram DNA de *L. braziliensis* em cicatrizes de lesões cutâneas de pacientes tratados e considerados clinicamente curados (Schubach et al., 1998) e em amostras de sangue, também de pacientes clinicamente curados (Guevara et al., 1993, 1994; Martins et al., 2010). Do mesmo modo, evidência do parasito foi confirmada em pacientes sem clínica ou histórico prévio de infecção (De Oliveira Camera et al., 2006). Mais recentemente, Figueroa e colaboradores (2009) destacaram a eficiência da técnica demonstrando a presença de DNA de *Leishmania* no tecido mucoso aparentemente normal de pacientes com leishmaniose cutânea ativa.

1.3. Terapêutica nas leishmanioses

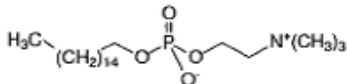
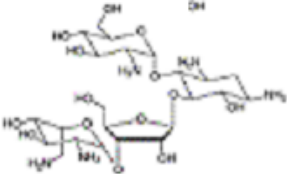
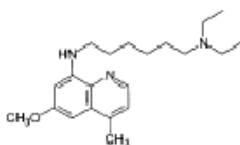
Apesar do uso medicinal de compostos de antimônio já serem utilizados para diversos fins desde a antiguidade, somente em 1912, Gaspar de Oliveira Vianna observou que o tártaro emético era eficaz na terapêutica da LTA. Três anos mais tarde, na Itália, este medicamento também foi introduzido no tratamento da leishmaniose visceral.

Devido aos efeitos tóxicos associados ao emprego do tártaro emético, como intolerância gastrintestinal e efeitos cardiotoxicos, os antimoniais trivalentes foram substituídos gradativamente por compostos pentavalentes, os quais vêm sendo empregados desde a década de 40 e constituem os medicamentos de primeira escolha atualmente para o tratamento das leishmanioses (Goodwin 1995; Herwaldt 1999; MS, 2010; WHO, 2010). As bases bioquímicas para sua efetividade são ainda pouco definidas, mas acredita-se que a inibição da síntese de ATP possa estar envolvida nesse

processo (Blum et al., 2009).

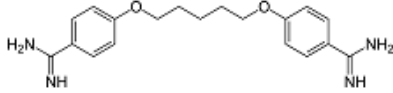
Além dos antimoniais, outros medicamentos são empregados no tratamento das leishmanioses, entre os quais se destacam a pentamidina, anfotericina B (desoxicolato e as formulações lipídicas), o miltefosine, a paromomicina e o alopurinol (Janvier et al., 2008; WHO, 2010).

Na figura 2 apresentamos a descrição desses fármacos e seus mecanismos de ação e efeitos adversos.

Descrição/fórmula estrutural	Mecanismo de ação	Efeitos adversos
<p>MILTEFOSINA (hexadecilfosfocolina (uso oral))</p> <ul style="list-style-type: none"> derivado alquilfosfolipídio com atividade antineoplásica 	<p>Modulação de receptores, metabolismo do inositol, ativação de fosfolipase, proteína quinase C e apoptose (Maly <i>et al.</i>, 1995; Verma & Dey, 2004; Luxe <i>et al.</i>, 2000; Paris <i>et al.</i>, 2004).</p>	<p>Distúrbios gastrointestinais, nefrotoxicidade, teratogenicidade (Sundar <i>et al.</i>, 1999; 2000; Soto <i>et al.</i>, 2007)</p>
<p>PAROMOMICINA (aminosidina)</p> <ul style="list-style-type: none"> antibiótico aminoglicosídeo 	<p>Indução de disfunções respiratórias e despolarização de membranas mitocondriais (Maarouf <i>et al.</i>, 1995; 1997)</p>	<p>Edema, prurido, irritação local (Soto <i>et al.</i>, 1995; Armijos <i>et al.</i>, 2004)</p>
<p>SITAMAQUINA</p> <ul style="list-style-type: none"> derivado da 8-aminoquinolina 	<p>Alteração do ciclo redox (Croft <i>et al.</i>, 2006) e cadeia transportadora de elétrons (Yeates, 2002); aumento produção de óxido nítrico (Buates & Matlashewski, 1999) ?</p>	<p>Nefropatia, metahemoglobina (Dietze <i>et al.</i>, 2001; Bhattacharya <i>et al.</i>, 2004).</p>

PENTAMIDINA

- diamidina aromática



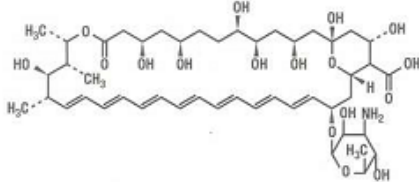
Biossíntese de poliamina e potencial de membrana mitocondrial (Bray *et al.*, 2003), ligação ao cinetoplasto de DNA (Fries & Fairlamb, 2003) inibição da síntese depoliaminas (Brochu *et al.*, 2003)

?

Cardiotoxicidade, diabetes mellitus insulina dependente irreversível e morte (Thakur *et al.*, 1991).

ANFOTERICINA B

- antibiótico antifúngico isolado de *Streptomyces nodosus*



Afinidade seletiva por ergosterol presentes na membrana do parasita (Goat *et al.*, 1984) e as formas lipídicas apresentam maior facilidade de chegada em macrófagos parasitados (Sundar *et al.*, 2000, 2004)

Febre alta, tromboflebite, miocardite, disfunção renal e morte.

ANTIMONIAIS PENTAVALENTES

- Antimoniato de *n*-metil glucamina (antimoniato de meglumina ou Glucantime®)
- Estibogluconato de sódio (Pentostam®)

Alteração do metabolismo energético, inibição da glicólise e β-oxidação de ácidos graxos e topoisomerases (Berman *et al.*, 1985; Berman *et al.*, 1987; Lucumi *et al.*, 1998) fragmentação do DNA (Serenio *et al.*, 2001, Sudhandiran & Shaha, 2003) e alteração do transporte de purinas pré-formadas (Carter *et al.*, 2000)

Nefrotoxicidade (Veiga *et al.* 1985), cardiotoxicidade hepatotoxicidade, embriotoxicidade (Miranda *et al.*, 2006)

? medicamentos para os quais os mecanismos de ação não estão bem esclarecidos.

Figura 2 – Principais medicamentos com ação leishmanicida, utilizados para o tratamento de diferentes formas das leishmanioses, segundo Friedrich, 2008.

A terapêutica com os antimoniais pentavalentes pode variar no que se refere ao esquema terapêutico empregado, duração e a dose total necessária para obtenção da cura clínica. Embora os antimoniais sejam considerados medicamentos eficazes, podem ocorrer resposta insatisfatória ou ausência de resposta e recidiva. A ausência de resposta ao estibogluconato de sódio e ao antimoniato de meglumina, principalmente nas leishmanioses visceral e mucocutânea, tem sido reconhecida como um sério problema em algumas regiões (Yardley *et al.*, 2006; Janvier *et al.*, 2008; Loiseau *et al.*, 2006).

A Organização Mundial de Saúde preconiza que as doses de antimoniais não devam ultrapassar 20 mg Sb^v/kg/dia, devido à sua elevada toxicidade. Mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos são alguns dos efeitos adversos frequentemente associados ao uso destes medicamentos (Rath, 2003).

Diversos esquemas terapêuticos têm sido utilizados para o tratamento das leishmanioses. As principais diferenças entre esses esquemas estão relacionadas ao uso do antimoniato de meglumina (cuja estrutura química é mostrada na figura 3) ou do estibogluconato de sódio, à administração contínua ou intermitente, à dose diária total, à duração do tratamento, aos critérios usados para a interrupção ou prolongamento do tratamento e às espécies de *Leishmania* envolvidas (Schubachet al., 2005).

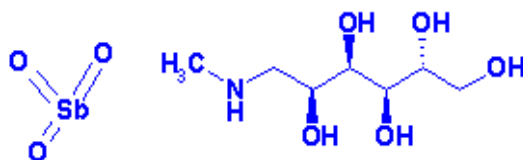


Figura 3 - Estrutura química do antimoniato de meglumina (Glucantime®).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), algumas formas de leishmaniose necessitam de doses de antimonial mais elevadas ou de tratamento mais longos (Quadro1).

No Brasil, independente da espécie ou quadro clínico, o antimoniato de meglumina é o medicamento de primeira opção para o tratamento das leishmanioses, seguindo recomendações do Ministério da Saúde (MS) (Ministério da Saúde, 2010).

Forma Clínica	Dose	Tempo de duração mínimo
Leishmaniose Cutânea	10 - 20mg/Sb ⁺⁵ /kg/dia (Recomenda-se 15mg/Sb ⁺⁵ /kg/dia)	20 dias
Leishmaniose Difusa	20mg/Sb ⁺⁵ /kg/dia	20 dias
Leishmaniose Mucosa	20mg/Sb ⁺⁵ /kg/dia	30 dias

Quadro 1- Esquema terapêutico preconizado para as diversas formas clínicas de LTA segundo OMS e Ministério da Saúde. Fonte: Manual de Vigilância em LTA, Ministério da Saúde, Brasil, 2010.

Entretanto, uma variabilidade de respostas ao tratamento é observada. A ocorrência de reativações e o desenvolvimento de lesões mucosas têm sido atribuídos, frequentemente, a cursos terapêuticos incompletos ou administrados de forma

inadequada. Entretanto, é possível que tal fenômeno também possa estar relacionado à variabilidade genética dos parasitos ou a fatores do hospedeiro (Weigle et al., 1985).

Apesar da recomendação em vigor (Ministério da Saúde, 2010), diferentes cenários de tratamento são relatados em diferentes estados brasileiros como Rio de Janeiro (Oliveira-Neto et al., 1997), Bahia (Romero et al., 2001) e Amazonas (Teixeira et al., 2008). Estes esquemas têm como pressuposto teórico ou observacional que diferentes espécies, assim como subpopulações da mesma espécie de *Leishmania* possam apresentar susceptibilidade variável aos antimoniais pentavalentes. Por exemplo, na infecção por *L. guyanensis*, foi relatada falha terapêutica em torno de 73,7% dos pacientes tratados, ao passo que no estado da Bahia, foi encontrada cerca de 49,2% de falha terapêutica em pacientes infectados por *L. braziliensis* (Romero et al., 2001).

No Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), no estado do Rio de Janeiro, há muitos anos utiliza-se o esquema terapêutico com 5mg Sb^v/kg/dia, baseado na observação que pacientes submetidos a estas doses apresentam resposta terapêutica similar a pacientes submetidos às doses de 20mg Sb^v/kg/dia. (Oliveira-Neto et al., 1996; Oliveira-Neto et al., 1997a; Oliveira-Neto et al., 1997b; Schubach et al., 2005). O esquema empregando baixas doses foi instituído visando diminuir os efeitos adversos observados. É admitido que o sucesso terapêutico com baixas doses de antimonial pentavalente, observado nos pacientes do estado do Rio de Janeiro, possa estar relacionado à características genéticas de *L. braziliensis* circulante nessa região e que, possivelmente esse resultado não seja observado em pacientes oriundos de outras regiões do Brasil. Atualmente, o grupo do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (VigiLeish) do IPEC está conduzindo um ensaio clínico, comparando diferentes doses e esquemas terapêuticos com o esquema padrão preconizado pelo Ministério da Saúde.

1.4. Mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes

O componente biologicamente ativo, a estrutura, a toxicidade seletiva e o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não são bem conhecidos. A hipótese de que o antimônio pentavalente (Sb^v) atue como uma pró-droga foi primeiramente formulada por Goodwin & Page em 1943. Posteriormente, outros autores também sugeriram que, para exercer a função leishmanicida, o antimonial deveria ser

convertido na forma trivalente (Sb^{III}), mais tóxica tanto para a forma amastigota quanto para a forma promastigota do parasito (Mottram & Coombs, 1985; Roberts et al., 1995; Sereno & Lemesre, 1997; Sereno et al., 1998).

Os antimoniais pentavalentes parecem atuar no mecanismo bioenergético das formas amastigotas de *Leishmania*, pela inibição da glicólise e da beta-oxidação que ocorrem nas organelas denominadas glicossomas, esta inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP. Outro mecanismo aventado é o de ligação com sítios sulfidrílicos, deflagrando a morte destes protozoários (Berman et al., 1985).

Alguns autores acreditam que a resposta favorável ao tratamento com antimoniais pentavalentes dependeria do pico sérico alcançado ou da manutenção de uma concentração sérica inibitória durante a maior parte do tempo (Chulay et al., 1988). A excreção rápida do antimônio pentavalente pela urina, resultando em níveis séricos considerados subterapêuticos em poucas horas, levou à interpretação errônea de que o risco de toxicidade cumulativa poderia ser baixo e que os esquemas terapêuticos intermitentes seriam farmacologicamente pouco eficazes (Rees et al., 1980; Oster et al., 1985; Berman 1988). No entanto, Mortari (2001) e Miekeley e colaboradores (2002) demonstraram que, apesar de grande parte do antimoniato de meglumina e do antimônio pentavalente administrado ser rapidamente excretado, uma pequena quantidade permanece detectável no sangue, cabelos e unhas por períodos superiores a 6 meses. Traços de antimônio podem ser detectados no cabelo de pacientes tratados até um ano após o término do tratamento. Provavelmente, o Sb^{V} é biotransformado em Sb^{III} , responsável pela toxicidade cumulativa e pelo efeito terapêutico durante os intervalos entre as séries de tratamento e após o término ou interrupção do tratamento por toxicidade (Dorea et al., 1987).

Os antimoniais alteram importantes funções biológicas de *Leishmania*. Nas formas amastigotas, o estibogluconato de sódio provavelmente age pela alteração do metabolismo energético, da inibição da glicólise e da β -oxidação de ácidos graxos (Berman et al., 1985; 1987). A ação leishmanicida da forma pentavalente *in vivo* está vinculada a respostas do hospedeiro, liberação de células T e citocinas enquanto sua atividade *in vitro* é limitada devido à ausência destas interações, que poderiam auxiliar na potencialização da ação do medicamento (Roberts & Rainey, 1993; Sereno & Lemesre, 1997). Já foi demonstrado que o antimônio trivalente pode induzir a apoptose de formas amastigotas, através da fragmentação do seu DNA e exposição de fosfatidilserina na parte externa da membrana plasmática (Sereno et al., 2001,

Sudhandiran & Shaha, 2003). Os antimoniais também parecem inibir topoisomerasas de *Leishmania* (Lucumi et al., 1998), formar complexos com biomoléculas de ribose (Demichelli et al., 2002) e interferir com o processo de translocação de purinas pré-formadas (Carter et al., 2000).

A hipótese de resistência parasitária, como já é observada em outros agravos, também tem sido especulada nas leishmanioses, principalmente, relacionada aos antimoniais pentavalentes (Heiner & Ouellette, 1998; Basselin et al., 1997; Guerin et al., 2002; Sundar et al., 2000). Por serem os antimoniais pentavalentes, os medicamentos de primeira escolha no tratamento das leishmanioses, é importante que a ocorrência de possível resistência a esse medicamento seja investigada, já que este fenômeno tem sugerido alertas em algumas regiões do mundo (Guerin et al., 2002; Sundar et al., 2000),

Casos de resistência ao tratamento com antimoniais pentavalentes vêm sendo relatados nos últimos anos (Carrio & Portus, 2002; Rojas et al., 2006; Hadighi et al., 2006; Singh et al., 2006; Mukherjee et al., 2007), principalmente na infecção por *L. donovani*, espécie responsável pela forma visceral em algumas regiões da África e Ásia (Sundar, 2000; Sundar et al., 2001; Thakur et al., 2004; Sundar & Chatterjee, 2006). O desenvolvimento de resistência pode ser causado por diversos fatores, tais como: a resposta imune do hospedeiro (Faraut-Gambarelli et al., 1997), a susceptibilidade ao medicamento e a biologia das espécies de *Leishmania* (Romero et al., 2001; Navin et al., 1992), a expressão de proteínas transportadoras (Mukherjee et al., 2007) e aspectos farmacológicos, tais como, metabolismo, excreção e enzimas de detoxificação (al Jaser et al., 1995).

A tripanotiona redutase (TR) é uma enzima presente nos tripanosomatídeos com função crucial para a sobrevivência do parasito, mantendo o ambiente redutor, protegendo o parasito contra o estresse oxidativo (Dumas et al., 1997; Tovar et al., 1998). Essa enzima está envolvida na desintoxicação de íons metálicos através da extrusão dos complexos formados (metal-(TS₂)) pela proteína transportadora, glicoproteína-P (PGPA) (Fairlamb & Cerami, 1992; Mukhopadhyay et al., 1996). Essa enzima tem sido bem estudada, pois já foi observado que a sua produção em elevadas quantidades ocorre em parasitos resistentes ao medicamento. Essa característica que faz com que a TR seja um alvo interessante em vários aspectos, mas principalmente para o planejamento de fármacos antiparasitários e monitoramento de amostras resistentes aos fármacos (Mukhopadhyay et al., 1996).

1.5. Definições relacionadas aos esquemas terapêuticos e critérios de cura utilizados pelo Ministério da Saúde Brasileiro (MS). Segundo Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana de 2010.

A falha no tratamento da LTA constitui um problema em diversas áreas endêmicas. Como mencionado anteriormente, a variabilidade de respostas à terapia pode ser devido a diferentes fatores. Após o tratamento, recomenda-se que o paciente retorne mensalmente à consulta durante três meses consecutivos, para avaliação da cura clínica. Entretanto, o critério de cura é definido pela regressão de todos os sinais clínicos das lesões tegumentares e comprovado pela ausência de lesão mucosa no exame otorrinolaringológico, até seis meses após a conclusão do esquema terapêutico.

O tratamento regular para a forma cutânea, é aquele que utiliza de 10 a 20 mg Sb^v/kg/dia entre 20 a 30 dias, não ocorrendo intervalos superiores a 72 horas entre as doses e para a forma mucosa, os casos que tenham utilizado 20 mg Sb^v/kg/dia entre 30 a 40 dias, também não ocorrendo intervalos superiores a 72 horas entre as doses.

É considerado como tratamento irregular os casos que tenham ultrapassado o tempo previsto para um tratamento regular ou que tenha ocorrido um intervalo superior a 72 horas entre as doses, tanto para a forma cutânea quanto para a forma mucosa.

Outras situações podem ser observadas ao longo do tratamento como falha terapêutica, definida pelos casos em que, mesmo tendo sido realizados dois esquemas terapêuticos regulares, o paciente não tenha apresentado remissão clínica e recidiva, que é definida por casos em que ocorre o reaparecimento de lesão, em qualquer parte do corpo no período de até um ano após a cura clínica da lesão primária. A recidiva pode estar ligada ao estado imune do paciente e à forma clínica da doença. No entanto, em áreas endêmicas, a distinção entre reativação e reinfeção nem sempre é uma tarefa simples, havendo a necessidade de estudos genéticos e identificação de subpopulações de parasitos circulantes na área.

Os casos de abandono incluem os pacientes que embora tenham cumprido o esquema terapêutico, não compareceram para avaliação clínica em até 30 dias após o terceiro agendamento. O terceiro agendamento se refere ao terceiro mês após o término do esquema terapêutico, período destinado ao acompanhamento do caso e à avaliação de cura.

Diante das exposições acima, verificamos que o tratamento das leishmanioses

envolve uma complexidade de fatores que deve ser considerada. Os medicamentos disponíveis apresentam algumas limitações, como a diversidade de efeitos adversos, necessidade de administração diária parenteral e o desenvolvimento de resistência ao medicamento.

A OMS recomenda que pesquisas de novos medicamentos para o tratamento das leishmanioses sejam incentivadas. Contudo, a falta de um razoável retorno comercial para as doenças negligenciadas tem resultado em investimentos insuficientes para a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos, tanto das agências do setor público quanto das indústrias farmacêuticas (Frézard et al., 2009). Apesar da falta de recursos, algumas pesquisas têm sido conduzidas para o desenvolvimento de novos protocolos e tratamentos quimioterápicos.

A química medicinal, ciência responsável pelo processo de desenvolvimento de novos fármacos, vem ganhando impulso graças a recentes avanços tecnológicos, principalmente nas áreas da biologia estrutural, molecular e química computacional. Hoje o desenvolvimento racional de fármacos é uma realidade, abrindo novas perspectivas quanto à descoberta de novos medicamentos ou buscando o melhoramento daqueles existentes. Algumas alternativas são o desenvolvimento de medicamentos a partir de microorganismos e plantas, novos medicamentos sintéticos como o Miltefosine (Impavido®), Paromomicina e a associação de medicamentos com citocinas para estimular o sistema imune (imunoterapia) (Santos et al., 2008).

Os antimoniais convencionais não podem ser administrados oralmente devido a sua pobre absorção e/ou inativação no estômago. Além disso, a administração parenteral requer múltiplas doses devido à rápida excreção pelos rins. Por isso, é desejável que a biodisponibilidade dos antimoniais, por via oral, seja melhorada. A associação de medicamentos com sistemas carreadores é uma estratégia viável para melhorar a absorção oral. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos compostos de glicoses unidas por ligações glicosídicas α -1,4. São capazes de incluir dentro de sua cavidade hidrofóbica, através de ligações não covalentes, moléculas insolúveis em água. Demicheli e colaboradores (2003; 2004) descreveram a preparação de uma composição de antimoniato de meglumina com β -ciclodextrina (β -CD), que melhorou a absorção de antimônio por via oral em modelo murino. Este estudo estabeleceu, pela primeira vez, o potencial da ciclodextrina para o tratamento oral das leishmanioses com antimonial pentavalente (Demicheli et al., 2003; 2004).

2. Justificativa

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças causadas por diferentes espécies de parasitos do gênero *Leishmania*, cuja infecção humana produz uma variedade de manifestações clínico-patológicas. O tratamento de primeira linha é realizado com antimoniais pentavalentes. A variabilidade observada na resposta terapêutica pode estar associada a fatores do hospedeiro ou a características intrínsecas dos parasitos envolvidos e, fenômenos de resistência parasitária aos antimoniais vêm sendo debatidos. No Brasil, mais particularmente no estado do Rio de Janeiro, o principal agente etiológico de LTA é *L. braziliensis*, espécie composta por subpopulações com variado grau de variabilidade genética (Brito, 2010). Admite-se que o padrão genético dos parasitos circulantes numa dada região possa modular aspectos relacionados à resposta terapêutica apresentada pelos indivíduos. Esse fato tem motivado estudos relacionados a aspectos intrínsecos dos parasitos, entre eles, o conhecimento da heterogeneidade genética e a determinação dos níveis de sensibilidade aos antimoniais pentavalentes em ensaios *in vitro*. Recentemente, o grupo do Vigileish/IPEC comparou amostras de *L. braziliensis* isoladas antes da introdução do tratamento com amostras isoladas após falha terapêutica de sete pacientes. Os níveis da dose letal de 50% (DL₅₀) ao antimoniato de meglumina foram mais elevados para as amostras isoladas pós-tratamento que para as amostras obtidas pré-tratamento, sugerindo uma possível seleção de subpopulações após os cursos terapêuticos. Entretanto, o pequeno número e as características do grupo de pacientes estudado não permitiram maiores conclusões (Baptista, 2011; Miranda, 2011). Já em outro estudo, pacientes com falha terapêutica apresentaram Intradermorreação de Montenegro (IDRM) menos intensas quando comparados aos pacientes que evoluíram para a cura clínica (Antônio, 2012). Estes resultados sugerem que tanto aspectos do paciente quanto dos parasitos possam estar modulando a resposta terapêutica na LTA.

Neste estudo, avaliou-se se a sensibilidade ao antimonial *in vitro* e a heterogeneidade genética de amostras de *L. braziliensis* isoladas, antes do tratamento, de pacientes oriundos do Rio de Janeiro ou de outros estados, teria ou não correlação com a resposta ao tratamento com antimoniato de meglumina (5mg Sb^V/kg/dia), para obter informações relacionadas aos parasitos e sua influência na resposta dos pacientes.

3. Objetivos

3.1. Geral

Comparar a sensibilidade *in vitro* ao antimoniato de meglumina e a heterogeneidade genética de formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* isoladas de pacientes com leishmaniose cutânea adquirida no estado do Rio de Janeiro ou em outros estados, sendo respondedores ou não respondedores ao tratamento com 5mg Sb^v/kg/dia.

3.2. Específicos

- ✓ Verificar em ensaios *in vitro*, se promastigotas de *L. braziliensis*, isoladas antes do tratamento, de pacientes respondedores ou não respondedores ao tratamento pelo antimoniato de meglumina, apresentam sensibilidade diferenciada ao antimonial pentavalente;
- ✓ Investigar se promastigotas de *L. braziliensis* isoladas antes do tratamento, de pacientes do Rio de Janeiro ou de outros estados apresentam sensibilidade diferenciada ao antimonial pentavalente em ensaios *in vitro*;
- ✓ Investigar uma possível associação entre padrões genéticos dos parasitos, a região de origem, a sensibilidade *in vitro* ao antimonial e a resposta ao tratamento pelo antimoniato de meglumina;
- ✓ Investigar uma possível associação entre os resultados da IDRM, do teste de ELISA, do número de leões ou do tempo de evolução e a resposta terapêutica.

4. Material e métodos

4.1. Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo analítico experimental visando avaliar a sensibilidade ao antimoniato de meglumina em amostras de *L. braziliensis* isoladas de pacientes que apresentaram diferentes desfechos ao tratamento da LC, comparando tal aspecto com padrões genéticos dos parasitos; com a origem dos pacientes selecionados e com os resultados da IDRM. Para este estudo foram utilizadas informações armazenadas no banco de dados dos pacientes e amostras de *Leishmania* sp. criopreservadas no Vigileish/IPEC da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

4.2. Sujeitos da Pesquisa e Amostras

A população de estudo foi constituída por pacientes com LC, diagnosticados e tratados no Vigileish no período 1999-2011. Foram incluídos somente casos submetidos a esquemas com baixas doses de antimoniato de meglumina (5mg Sb^v/kg/dia), administrados por via intramuscular, de forma contínua e com 12 meses de observação pós-tratamento. O tamanho amostral foi de conveniência, considerado o seguinte desfecho terapêutico:

pacientes Respondedores (R) - epitelização completa das lesões cutâneas até 3 meses após o término do tratamento, sem qualquer sinal de reativação durante o período de observação de um ano.

pacientes Não Respondedores (NR)- ausência de epitelização completa das lesões cutâneas até 3 meses após o término do tratamento, necessitando de novo esquema terapêutico ou os casos que mesmo após a epitelização houve recidiva das lesões, considerando o período de observação de um ano.

As amostras de *Leishmania* sp. obtidas dos pacientes selecionados foram avaliadas nos ensaios *in vitro* e, considerou-se somente amostras isoladas antes da introdução do tratamento nesses pacientes. Foram constituídos quatro subgrupos, a saber:

Grupo R_{RJ}: pacientes **Respondedores** ao tratamento, cuja infecção tenha sido adquirida no estado do Rio de Janeiro;

Grupo R_{OE}: pacientes **Respondedores** ao tratamento, cuja infecção tenha sido adquirida em outros estados brasileiros;

Grupo NR_{RJ}: pacientes **Não Respondedores** ao tratamento, cuja infecção tenha sido adquirida no estado do Rio de Janeiro;

Grupo NR_{OE}: pacientes **Não Respondedores** ao tratamento, cuja infecção tenha sido adquirida em outros estados brasileiros.

4.2.1. Critérios de inclusão dos pacientes e amostras

- Pacientes com diagnóstico de LC por isolamento de *Leishmania* em cultura, cujas amostras puderam ser recuperadas do criobanco do Vigileish;
- Amostras caracterizadas como *L. braziliensis*, sem variantes isoenzimáticas;
- Pacientes de ambos os gêneros;
- 1º tratamento no Vigileish com antimoniato de meglumina (5mg Sb^v/kg /dia), por via intramuscular durante 30 dias contínuos;

4.2.2. Critérios de exclusão de pacientes e amostras

- Co-morbidades tais como: HIV, hepatites, tuberculose, hanseníase, cuja informação foi obtida nos prontuários.

4.3. Etapas envolvendo a obtenção e manipulação das amostras de Leishmania

4.3.1. Isolamento e criopreservação das amostras

As amostras de *Leishmania* avaliadas neste estudo foram obtidas conforme protocolo para investigação diagnóstica dos pacientes atendidos no Vigileish. Descreveremos resumidamente esse procedimento que compreende a coleta de fragmentos de lesão cutânea e o isolamento parasitário: o fragmento da lesão cutânea coletado por biópsia foi colocado imediatamente em solução salina contendo antibióticos e antifúngico (1000U de penicilina, 200µg de estreptomicina e 100µg de 5'fluorocitosina), sendo conservado nessa solução durante 24 horas à temperatura de 4°C em geladeira. Após esse período, o fragmento foi fracionado e transferido para três tubos contendo meio de cultura bifásico NNN (Novy, Nicolle & McNeal, 1908) e meio de Schneider (Sigma), enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab). Em seguida, os tubos foram mantidos em estufa incubadora com temperatura entre 26 e 28°C, durante 30 dias. Inspeções visuais das culturas por microscopia ótica foram

realizadas em intervalos semanais, durante 30 dias em preparações a fresco obtidas da fase líquida do meio. Os isolados de formas promastigotas foram repicados para garrafas contendo um volume maior de meio de cultura para expansão do crescimento e posterior criopreservação.

Visando manter a infectividade das amostras de *Leishmania* sp. isoladas, a criopreservação deve ser realizada até a 5ª passagem (repiques) em meio de cultura. Para isso, logo após o isolamento, foi realizada uma expansão parasitária, para obtenção de 15 a 20 mL de cultura em fase exponencial. O sedimento resultante da centrifugação (7000 rpm/15 minutos) foi ressuspensão em cerca de 2,0 mL de “Freezing Solution” (meio BHI contendo 30% de SFB e 10% de glicerol) e, após homogeneização, a suspensão de parasitos foi então transferida para criotubos com capacidade de 1,8 mL e submetidos à refrigeração gradual: 1 hora à 4°C, 2 horas a -20°C, 2 horas em gelo seco. Em seguida, os criotubos foram armazenados em caixas numeradas nos botijões de nitrogênio líquido (N₂).

4.3.2. Recuperação das amostras do nitrogênio líquido

As amostras de *Leishmania* sp. criopreservadas, foram retiradas do criobanco (N₂), semeadas em meio de cultura bifásico (NNN + meio de Schneider, contendo 10% de SFB) e crescidas para obtenção de massas parasitárias que foram utilizadas nos ensaios propostos neste estudo.

Inicialmente, após descongelamento da amostra em temperatura ambiente, realizou-se exame a fresco para observação da motilidade das formas promastigotas, sendo o conteúdo (cerca de 1 mL) semeado em dois tubos contendo o meio NNN, acrescido de meio de Schneider (Sigma), suplementados com 10% de SFB (Cultilab) contendo antibióticos associados (penicilina G potássica: 200 unidades/mL e estreptomicina: 200µg/mL). Os tubos foram examinados semanalmente por meio de exames a fresco em microscópio óptico e quando observado crescimento satisfatório as amostras foram repicadas para obtenção da massa parasitária. Foram retiradas novas alíquotas do N₂ e repetido o processo descrito anteriormente para as amostras que não apresentaram crescimento.

4.3.3. Preparo das massas parasitárias para a técnica de isoenzimas e PCR

Para realização da técnica de isoenzimas, foi necessário obter uma massa na ordem de 10^9 parasitos. Para tal, as amostras crescidas em tubos, foram transferidas, com inóculo aproximado de 10%, para garrafas de cultivo celular (TPP – 75cm²) contendo meio bifásico (NNN/Schneider) acrescido de SFB e antibióticos na mesma proporção citada para o isolamento. O crescimento foi acompanhado em microscópio invertido, adicionando-se meio de Schneider completo em volumes e intervalos de acordo com o crescimento da amostra, até obtenção de um volume de cultura com cerca de 60-80 mL. Em fase exponencial, a cultura foi transferida para tubos tipo FALCON e centrifugada a 7000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após desprezar o sobrenadante as culturas foram submetidas a duas lavagens utilizando solução tampão de lavagem (NaCl 0,85% adicionada de 0,01M de EDTA, pH 8,0). Na última etapa, o sedimento parasitário foi ressuspensão em quatro mililitros do tampão de lavagem, cujo volume final foi dividido para dois criotubos e submetido a nova centrifugação. Após, o sobrenadante foi desprezado e os sedimentos devidamente identificados foram estocados em N₂. Um tubo foi empregado na técnica de isoenzimas e o outro nos ensaios de PCR.

4.4. Identificação das amostras através da eletroforese de isoenzimas - Multi-Locus Enzyme Electrophoresis (MLEE)

A identificação etiológica foi realizada através da eletroforese de isoenzimas, seguindo protocolos descritos por Pacheco et al, 1995 e Cupolillo et al, 1994; utilizando 6 sistemas enzimáticos: 6PGDH (6-fosfogluconato desidrogenase, EC.1.1.1.43); GPI (fosfoglucose isomerase, EC.5.3.1.9); NH (nucleosídeo hidrolase, 2 loci, EC. 3.2.2.1); G6PDH (Glucose-6-fosfato desidrogenase, EC.1.1.1.49); MDH (malato desidrogenase, EC.1.1.1.37) e ME (enzima málica, EC.1.1.1.40). Empregou-se como referência as amostras de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147) e *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), obtidas junto à Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC).

A preparação do gel de agarose para a técnica de isoenzimas foi realizada na concentração de 1% em diluição de 1:1 de água destilada e solução tampão de reação. O tipo de tampão utilizado foi escolhido segundo a enzima a ser testada, sendo o mesmo tampão utilizado nas corridas eletroforéticas (Tabela 1).

Tabela 1- Soluções tampão utilizados na preparação dos géis e nas corridas eletroforéticas pelo *VigiLeish/IPEC/FIOCRUZ*.

Solução Tampão	Reagentes e preparo
<p><u>Tampão Tris Maleico, pH 7,4</u> Utilizado nos seguintes sistemas enzimáticos: 6PGDH, GPI, NH₁ e NH₂, MDH,</p>	<p>Tris base (24,22g), Acido maleico (10,0g), MgCl₂ (0,19g), EDTA (0,74g). H₂O q.s.p 2 litros. Dissolver todos os reagentes e acertar o pH para 7,4. Estocar a 4°C</p>
<p><u>Tampão Fosfato, pH 8,0</u> Utilizado nos seguintes sistemas enzimáticos: G6PDH, ME</p>	<p>Na₂HPO₄.H₂O (solução A - estoque 1M), NaH₂PO₄ (solução B- estoque 1M). Mistura 13,6 mL da solução A e 186,4 mL da solução B e completa para 1 litro com H₂O destilada. Estocar a temperatura ambiente</p>

Legenda: MgCl₂- Cloreto de magnésio
 EDTA-Ácido etilenodiamino tetra-acético
 Na₂ HPO₄H₂O- Fosfato de sódio hidratado
 NaH₂PO₄- Diidrogeno fosfato de sódio

A agarose utilizada foi a do Tipo V (Sigma) e uma vez pesada a quantidade necessária, foi adicionado o tampão (maleico ou fosfato) e a água, levando-se ao forno de microondas para ser dissolvida. A dissolução completa da agarose foi obtida aquecendo até que a mistura tornou-se transparente e sem precipitados. Utilizou-se a potência alta por cerca de 5 minutos. Com a agarose completamente dissolvida e ainda quente, a solução (cerca de 50 mL) foi derramada sobre um suporte de poliestireno (Filme Gelbond®, GE Healthcare), o qual era apoiado sobre uma placa de vidro devidamente nivelada, garantindo um espalhamento uniforme da agarose. Após a solidificação natural da agarose a temperatura ambiente, o gel foi estocado em câmara úmida e escura em geladeira (4°-8°C) por no máximo 24 horas. No momento do uso, a umidade dos géis foi absorvida utilizando-se um papel de filtro que era posicionado e pressionado levemente contra o gel.

Para aplicação das amostras, foi colocada sobre o gel uma fita plástica contendo 24 retângulos vazados e equidistantes que foram numerados de 1 a 24 de acordo com a ordem das amostras aplicadas, as quais foram identificadas em formulário próprio. Inicialmente, aplicou-se cerca de 5µl da solução corante (Tabela 2) nas ranhuras das extremidades do gel, objetivando gerar um marcador, facilitando a visualização da corrida eletroforética. Uma vez absorvidos os corantes, prosseguia-se com a aplicação das amostras a serem analisadas e das amostras de referências sobre o gel.

As amostras retiradas do N₂ foram mantidas em gelo e no momento do uso, foram homogeneizadas e, quando necessário, acrescentava-se um pouco de tampão de lavagem (~ 50µl). Empregando um pipetador automático, cerca de 5µl de cada amostra foi aplicado em cada um dos quadrículos da fita. Depois das amostras serem completamente absorvidas pelo gel, procedia-se a retirada da fita plástica, sendo o gel transferido para uma cuba de eletroforese horizontal (Pharmacia Biotech modelo Multiphor II) acoplada a um banho Maria com circulação constante de água, para manter a refrigeração das cubas em torno de 4°C. O tampão (maleico ou fosfato, dependendo do sistema enzimático) foi colocado nas laterais da cuba, previamente nivelada, e foi feita uma ponte para condução de energia entre os eletrodos (pólo positivo e pólo negativo) e o gel. Esse procedimento foi realizado por meio de esponjas, que tiveram uma das laterais mergulhada no tampão e a outra bem alinhada sobre as laterais do gel. Após, foi colocada a tampa da cuba e, aplicou-se uma corrente elétrica de 40 volts para as corridas realizadas em tampão fosfato e de 60 volts para as corridas em tampão maleico. O término da corrida foi determinado quando os corantes alcançavam a extremidade do gel, considerando o primeiro ou segundo marcador, dependendo do sistema enzimático a ser revelado. A revelação da atividade enzimática foi feita acondicionando os géis em recipientes plásticos e colocando-se diretamente sobre ele uma mistura contendo os substratos, transportadores e receptores de elétrons, cofatores e tampões próprios para cada sistema enzimático estudado, apresentados na Tabela 3. Visando facilitar a revelação, os géis foram colocados no escuro em estufa a 37°C e assim que as bandas eram visualizadas no gel, a reação foi interrompida, colocando-se sobre o gel uma solução de ácido acético a 5%, sendo tal solução trocada quantas vezes fosse necessário até que o excesso de corante do sistema revelador fosse completamente eliminado do gel, deixando-os apenas com as bandas eletroforéticas marcadas. Após esse processo, os géis foram deixados à temperatura ambiente até secarem completamente.

Tabela 2- Solução corante utilizada na corrida eletroforética de isoenzimas pelo VigiLeish, IPEC, FioCruz.

Corante	Quantidade	Modo de preparo
Azul de bromofenol	34 mg	Pesar as quantidades de cada corante e dissolver em 10 mL de H ₂ O destilada. Estocar a 4°C
Xilencianol	28 mg	

Tabela 3- Protocolos utilizados no processo de revelação das enzimas estudadas, indicando substratos, coenzimas, ativadores, enzimas de ligação específica para cada sistema enzimático e os métodos de visualização empregados pelo VigiLeish, IPEC, FioCruz.

Enzima	Tampão TRIS HCl 0,05M	H ₂ O	Substrato 200mg/10m L	Coenzima 40mg/10mL	Ativadores 4g/20mL	Enzima de Ligação	Visualização	Agarose
GPI	4mL pH 8,0	1m L	1mL F-6-P	1mL NADP	200µL MgCl ₂	2U G6PDH	2mL MTT 1mL PMS	10mL
G6PDH	4mL pH 7,4	-	1mL G-6-P	2mL NADP	300µL MgCl ₂	-	2mL MTT 1mL PMS	10mL
MDH	4mL pH 8,0	-	1mL 1M Na Malate 1,78g/10m L	2mL NAD	-	-	2mL MTT 1mL PMS	10mL
ME	4mL pH 7,4	1m L	1mL 1M Na Malate	1mL NADP	200µL MgCl ₂	-	2mL MTT 1mL PMS	10mL
NH	4mL pH 7,4	3m L	30mg Inosine	-	-	2U xantine oxidase	2mL MTT 1mL PMS	10mL
6PGDH	4mL pH 8,0	-	2mL 6-P-G	1mL NADP	500µL MgCl ₂	-	2mL MTT 1mL PMS	10mL

MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium bromide)
PMS (Phenazine Methosulfate)

A análise foi feita através da comparação visual do perfil dos eletromorfos, que são as bandas visualizadas no gel após a corrida, com o padrão das amostras utilizadas como referência.

Das 60 amostras selecionadas e retiradas do N₂, duas foram identificadas como *L. guyanensis* quatro amostras apresentaram padrão eletroforético diferente das amostras de referência, não sendo incluídas no estudo.

4.5. Ensaios de avaliação da sensibilidade ao antimoniato de meglumina

Para estes ensaios, considerou-se o 3° ou 4° dia de crescimento das amostras, que correspondiam à fase estacionária de amostras de *L. braziliensis*, identificada após a curva de crescimento realizada por Miranda (2011) e apresentada na Figura 4. As amostras foram crescidas nas mesmas condições, utilizando garrafas de cultura contendo 10 mL de meio de Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino e antibióticos associados.

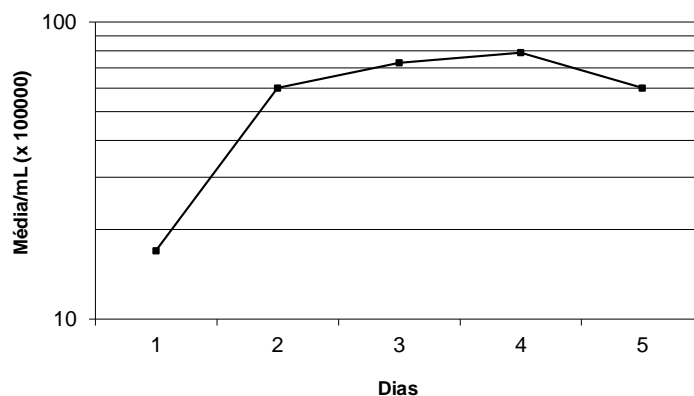


Figura 4- Perfil da curva de crescimento de formas promastigostas de *Leishmania braziliensis* obtida do estudo de Miranda, 2011. O eixo Y mostra o número médio de parasitos por mL, obtidos em cada ponto, multiplicados por 10^5 e o eixo X o período de observação do crescimento.

Para este ensaio, retiramos outro tubo contendo a amostra criopreservada. Isto foi realizado para garantir o mínimo de passagens da amostra em cultura e, conseqüentemente a sua infectividade. A amostra foi retirada do N_2 e semeada em meio de cultura bifásico (NNN + meio Schneider's, contendo 10% de SFB) e colocados em estufa à temperatura de 26-28°C durante cerca de sete dias, até alcançar um crescimento ideal para que a amostra pudesse ser expandida e utilizada nos ensaios. Quando necessário, era realizado um repique nessa mesma condição. Quando observávamos que a amostra possuía parasitas suficientes, era então semeada em garrafas (25cm²) contendo 10 mL de meio Schneider's, suplementado com 10% de SFB e adição de antibióticos (200U de penicilina + 100µg de estreptomicina) e colocada na mesma temperatura. O crescimento foi controlado por microscopia, sendo as amostras utilizadas sempre no 3º ou 4º dia do crescimento, sem adição de meio de cultura nesse período. Todos os ensaios foram realizados considerando essas condições, visando uniformizar a fase de crescimento dos parasitos em todos os ensaios.

A sensibilidade ao antimônio pentavalente foi avaliada utilizando antimoniato de meglumina (Glucantime[®]), obtido junto ao setor farmacêutico do IPEC. O antimoniato de meglumina apresenta-se em ampolas de 5 mL, contendo 81 mg Sb^V/mL, as quais foram armazenadas a temperatura ambiente durante a realização do estudo.

Para os ensaios, utilizamos parasitos infectivos, de fase estacionária,

estabelecida após a curva de crescimento, como mencionado acima. A avaliação de sensibilidade foi realizada em placas para cultura de 96 poços e avaliada após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de Sb^v. Descreveremos brevemente os passos do ensaio: inicialmente a cultura crescida em garrafas foi submetida à centrifugação e ajustada para concentração 4 x 10⁶ parasitos/mL diluídos em meio de Schneider. Cem microlitros (100 µL) dessa suspensão foram colocados, em triplicatas, em placas de 96 poços já contendo o mesmo volume (100µL) de antimoniato de meglumina. Foram empregadas diluições seriadas ao dobro, iniciando na concentração de 8,1 mg/mL até 3,955 µg/mL de Sb^v (Baptista et al., 2009). As placas foram incubadas em estufa biológica (26-28°C), e após 24 horas, os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer empregando corante vital (Azul de Trypan 0,1% em PBS) (Machado et al, 2007).

A quantificação foi realizada em triplicatas e considerou os parasitos vivos. Os valores foram inseridos em planilhas do software Excel[®] para determinação do número de parasitos mortos, considerando os dados dos controles, como descrito por Machado e colaboradores (2007). A atividade leishmanicida foi expressa em valores de DL₅₀ (Dose Letal, mg/mL), indicando a concentração de Sb^v necessária para a inibição de 50% do crescimento do parasito.

4.6. *Análise da variabilidade genética de Leishmania braziliensis através de LSSP-PCR (Low-Stringency Single-Specific-Primer)*

Nesta etapa, buscamos avaliar o perfil genético das amostras de *L. braziliensis*, comparando dois grupos bem definidos: isolados provenientes de pacientes Respondedores e Não Respondedores ao tratamento da LC, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase com Primer Único em Condições de Baixa Estringência (LSSP-PCR).

4.6.1. *Extração do DNA*

Utilizou-se o Illustra tissue & cells genomic Prep Mini Spin Kit (GE Helthcare). O procedimento de extração do DNA para este kit é descrito a seguir: ao sedimento de parasitos, obtidos como descrito no item 4.4.3, foi adicionado 100 µl de lysis buffer type 1, homogeneizando com a pipeta e em seguida agitado no vortex por 15 segundos. Após, foram adicionados 10µl de proteinase K diluída a 20 mg/ mL (GE Helthcare) e

novamente agitou-se a solução em vortex por 15 segundos. O volume total foi transferido para microtubos (Eppendorf) que foram incubados em banho Maria, a temperatura de 56°C durante 1 hora, com agitações periódicas e depois outra incubação foi feita por 2 minutos a 70°C. Os microtubos foram centrifugados por 10 segundos a 5000 rotações por minuto (rpm), com o objetivo de baixar qualquer sedimento que tivesse evaporado. Foram adicionados 5µl de RNase A diluída a 20 mg/ mL (Invitrogen) e os microtubos foram incubados por 15 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados, a cada microtubo, 500µl de Lysis buffer type 4 e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente, após o tempo de incubação o material foi centrifugado por 10 segundos a 11000 rpm. Com auxílio de uma pipeta, o material foi transferido para tubos coletores específicos com mini colunas acopladas (fornecido no kit) e centrifugados por 2 minutos a 11000 rpm. O sobrenadante foi descartado e novamente foram adicionados 500µl de Lysis buffer type 4 a mini coluna, centrifugando por 2 minutos a 11000 rpm e descartando o sobrenadante. Após, foram adicionados 500µl de Wash buffer type 6 e centrifugou-se por 3 minutos a 11000 rpm, então o sobrenadante, junto com o tubo coletor foram descartados. Microtubos estéreis de 1.5 mL foram identificados com os códigos das amostras e as mini colunas foram transferidas para estes. Foram adicionados bem no centro da membrana 50µl de Elution buffer type 5, previamente aquecido a 70°C por 2 minutos, e os microtubos centrifugados por 2 minutos a 11000 rpm. A mini coluna foi descartada e os microtubos identificados contendo o DNA foram armazenados a - 20°C até o momento do uso. Após a extração foi feita uma quantificação do material obtido por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, como segue: a Ultra Pure Agarose (Invitrogen) foi pesada e diluída em tampão TBE 1x (Tampão Tris, Ácido bórico e EDTA), então foi posta no microondas para que derretesse, 1 minuto por vez, agitando lentamente o erlemmeyer ao fim de cada minuto. O material foi resfriado em água corrente rapidamente e vertido em cuba de eletroforese previamente preparada, foi deixado em repouso por 30 minutos, para enrigecer. As amostras foram preparadas da seguinte maneira: 1 µL de amostra + 1 µL de corante + 8 µL de água ultrapura. Foram aplicadas no gel, seguidas do padrão de peso molecular e foi feita a corrida eletroforética a 80 Volts por 1 hora. A revelação do gel foi feita por meio de leve agotação em brometo de etídio a 3% por 10 minutos, após mais 10 minutos em água destilada.

4.6.2. Reação da PCR específica e da LSSP-PCR

Inicialmente foi realizada a PCR específica para o complexo *L. braziliensis* utilizando os iniciadores **B1** (5'GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG3') e **B2**(5'CTAATTGTGCACGGGGAGG3') que são alvos direcionados à região variável dos minicículos de kDNA e amplificam um produto de 750 pb específicos para as espécies do complexo *L. braziliensis* (De Bruijn & Baker, 1992). As condições para realização da PCR foram as seguintes: desnaturação a 95°C por três minutos seguido por 33 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60,5°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto com um ciclo final de extensão de 72°C por 10 minutos. Após a PCR específica, foi feita a quantificação do material obtido, como descrito no item 4.6.1. Então procedeu-se uma etapa de purificação do produto amplificado usando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Helthcare), onde os produtos foram transferidos para tubos de 1,5 mL identificados e foram adicionados 500µl de Capture buffer type 3 a cada tubo, centrifugando por 20 segundos a 8000 rpm. Todo o material foi transferido para as mini colunas contidas no kit, que foram montadas em seus tubos específicos e novamente centrifugados por um minuto a 14000 rpm, sendo o sobrenadante desprezado e adicionados 500µl de Wash buffer type 1 às mini colunas. A centrifugação foi feita por 2 minutos a 14000 rpm e os sobrenadantes e tubos foram descartados, sendo as mini colunas transferidas para novos tubos identificados. Então, 30µl de Elution buffer type 4 foram colocados bem no centro da membrana e incubaram em temperatura ambiente por 1 minuto. Nova centrifugação foi feita por 1 minuto a 14000 rpm, as mini colunas foram descartadas e os tubos contendo o produto purificado foram estocados a -20°C. Novamente foi feita a quantificação do material obtido, como descrito no item 4.6.1.

A técnica LSSP-PCR está baseada nos mesmos princípios da PCR e consiste na re-amplificação de um fragmento alvo de DNA, previamente amplificado, sob condições de baixa estringência utilizando-se concentrações elevadas de Taq DNA polimerase e apenas um dos iniciadores específicos para uma das extremidades do fragmento analisado (Pena et al., 1994).

Assim, o produto amplificado pelos iniciadores **B₁/B₂** e purificado foi submetido a uma segunda amplificação utilizando apenas um dos iniciadores específicos, **B1** (5'GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG3'), em condições de baixa estringência e concentrações elevadas de Taq DNA polimerase segundo protocolo de

Oliveira et al. (2010), com modificações na mudança do número de ciclos de 35 para 44 utilização de pérolas liofilizadas (kit Ready-To-Go PCR Analysis Beads – GE Healthcare) contendo polimerases termoestáveis (AmpliTaq™ DNA polimerase e Fragmento Stoffel), dNTPs (0.4 mM de cada Desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dNTP) em um volume de reação de 25 µl), Albumina sérico bovina (BSA) (2.5 µg) e tampão (3 mM MgCl₂, 30 mM KCl e 10 mM Tris, pH 8.3). Cada tubo de reação continha um volume final de 25 µl, com 40 pmol do iniciador **B1**, 3 µl do produto de PCR + pérola liofilizada Ready-To-Go, e água ultra pura para PCR. Os ciclos de amplificação contemplaram um passo inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 36°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos e, com uma extensão final do ciclo a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos gerados após a re-amplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose (High Resolution, Sigma) a 1,8% em TBE 1X (Tampão Tris, Ácido bórico e EDTA), submetidos a uma corrida de 80Volts (V) por 5 horas.

Os perfis gerados através da LSSP-PCR foram comparados usando-se o coeficiente de similaridade Simple Matching, para determinar a proporção dos fragmentos semelhantes entre as amostras estudadas. Cada fragmento observado no gel foi numerado, começando com 1 para o fragmento de maior tamanho em pares de base, 2 para o fragmento seguinte e assim por diante. Com a utilização do coeficiente foi produzido uma matriz de similaridade através de todas as possíveis combinações entre as amostras. A matriz foi transformada em um dendrograma pelo método não ponderado de agrupamento aos pares por média aritmética (UPGMA) (Sneath & Sokal, 1973) e a análise numérica foi realizada com o programa “NTSYS-pc software” (Versão 1.70, Exeter Software).

4.7. Análises dos resultados e associações com dados dos pacientes

As análises foram realizadas visando comparar os resultados obtidos neste estudo com dados extraídos do banco de informações dos pacientes estudados, considerando os grupos Respondedores e Não Respondedores e o local de infecção destes pacientes. Nesta análise foram considerados também, os resultados da Intradermoreação de Montenegro (IDRM).

Inicialmente foram realizadas análises exploratórias dos dados a partir das frequências das variáveis qualitativas tais como gênero, resposta ao IDRM, reatividade

ao Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), localização das lesões, padrão de heterogeneidade genética dos parasitos, origem dos pacientes (Rio de Janeiro ou outros estados) e desfecho do tratamento (Respondedores ou Não Respondedores); e medidas de dispersão para as variáveis quantitativas como idade, número de lesões, tempo de evolução clínica até o diagnóstico e início do tratamento, valor do IDR e níveis de DL₅₀. Nos casos de Não Respondedores foi considerado para o desfecho final a falha no tratamento ou a reativação das lesões durante o período de um ano de observação, com necessidade de retratamento.

Para determinação da DL₅₀ das amostras, foi empregado o software Excel® com análises pelo teste *T* de *Student* (Machado et al, 2007). Para as comparações entre os grupos, considerando os níveis da DL₅₀ das amostras e os resultados da IDR foram utilizados testes não paramétricos, como Man Whitney e *T* de *Student*, considerando *P*-valores <0,05 nos testes estatísticos como associações significantes através do software GraphPadPrism 5.0. Para avaliação dos resultados de ELISA, foram coletados dados dos pacientes pré-tratamento, onde foram considerados como reatores ou não ao teste. Para avaliação da heterogeneidade genética das amostras foram utilizados os programas NTedit 1.0.1.4 para construção da matriz de similaridade e o software NTsys 2.0.1.5 para construção dos dendrogramas.

4.8. Aspectos éticos

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/IPEC) obtendo aprovação para sua realização sob o número: 0065.0.009.000-11 (Anexo 3).

Este estudo constitui um desdobramento do projeto “Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com leishmaniose tegumentar americana no Centro de Referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz”, aprovado pelo CEP/IPEC sob número de protocolo 0016.0.009.-02 e do projeto “Sensibilidade ao antimonial pentavalente *in vitro* de amostras de *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas antes e após o tratamento de pacientes com falha terapêutica” sob o número de protocolo 0050.0.009.000-10. Todos os pacientes cujas amostras foram estudadas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1), o qual contempla a utilização das amostras.

5. Resultados

5.1. Pacientes

Em consulta inicial ao banco de dados do Vigileish, foram identificados 362 pacientes dentro do período do estudo, destes 244 não corresponderam aos critérios de seleção, então encontramos 118 pacientes com primeiro tratamento no IPEC com 5 mg Sb^v/kg/dia, durante 30 dias, com administração por via intramuscular. Destes, apenas 73 amostras encontravam-se estocadas no nitrogênio líquido (N₂), sendo retiradas para o estudo em grupos de seis, de forma aleatória. Das 73 amostras retiradas, não foi possível a recuperação de 13 delas (17,8%), sendo nove casos do grupo Respondedor (oito do subgrupo R_{RJ} e um do subgrupo R_{OE}) e quatro do grupo Não Respondedor (dois do subgrupo NR_{RJ} e dois do subgrupo NR_{OE}), mesmo depois de repetido o processo de descongelamento de outras ampolas estocadas no N₂. Destas, 12 amostras estavam estocadas há mais de seis anos e, por isso, podem ter se tornado inviáveis. Das 60 amostras recuperadas e analisadas por isoenzimas, 54 foram caracterizadas como *L. braziliensis* apresentando padrão eletroforético igual à cepa de referência de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e então incluídas no estudo. Duas amostras isoladas de pacientes pertencentes ao grupo NR_{OE}, os quais provavelmente adquiriram a infecção na cidade de Manaus (AM), foram caracterizadas como *L. guyanensis*. Outras quatro amostras não puderam ser caracterizadas, sendo que duas dessas quatro eram isoladas de pacientes que possivelmente adquiriram a infecção na região amazônica. Abaixo apresentamos um fluxograma contendo as etapas que envolveram a seleção das amostras que foram estudadas.

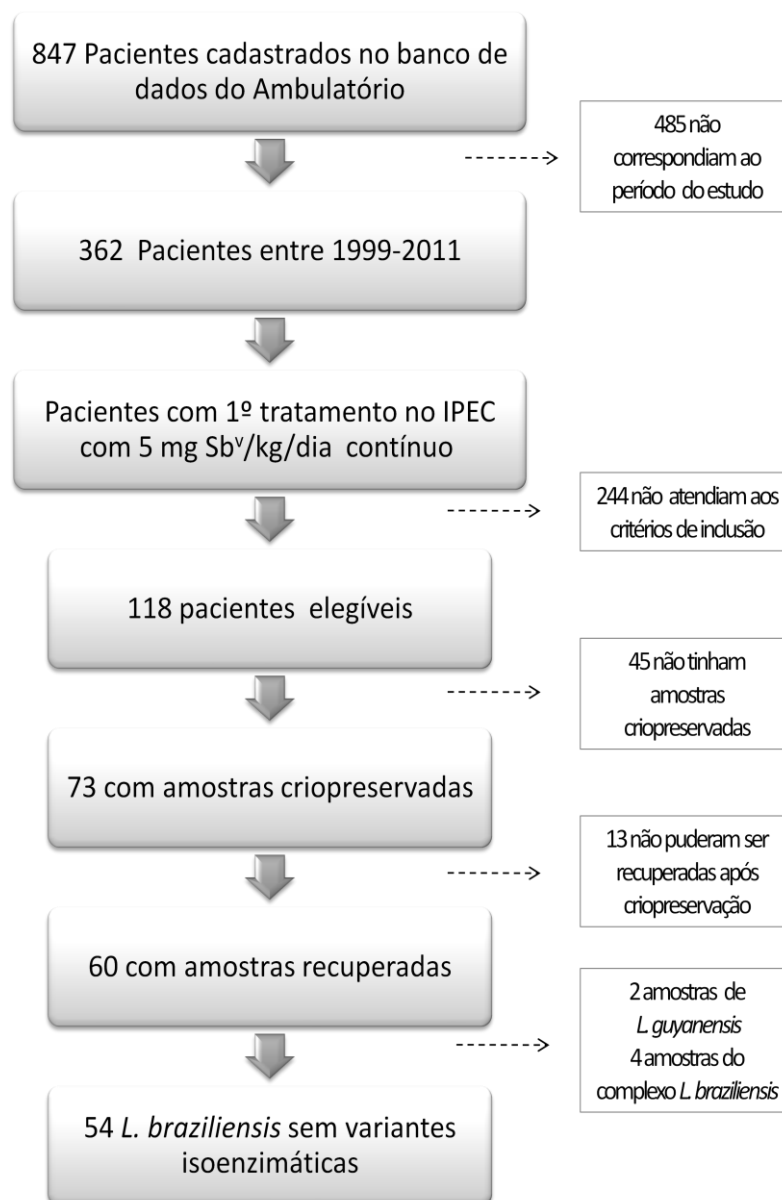


Figura 5- Fluxograma com as etapas para seleção de amostras para o estudo. VigiLeish, IPEC, FIOCRUZ, 2012.

O grupo de pacientes Respondedores foi constituído por 26 pacientes, sendo 16 mulheres e 10 homens, com idades variando entre 11 e 63 anos (mediana de 40,5 anos). Destes, 16 pacientes adquiriram a LC no estado do Rio de Janeiro (subgrupo **R_{RJ}**) e 10 em outros estados do Brasil (subgrupo **R_{OE}**). No subgrupo **R_{RJ}** a idade variou de 22 a 57 anos (mediana de 40 anos), o número de lesões variou entre uma e duas (mediana de 1 lesão) e o tempo de evolução até o diagnóstico e início do tratamento variou de um a três meses (mediana de 1 mês). Com relação aos resultados dos exames imunológicos, 15 pacientes (93,7%) apresentaram resultado de IDRM positiva com valores variando de 7 a 60 mm (mediana de 20 mm) e 10 pacientes (62,5%) apresentaram reatividade

sorológica ao teste de ELISA. No subgrupo **R_{OE}** a idade variou de 11 a 63 anos (mediana de 42,5 anos), o número de lesões variou de uma a três (mediana de 2 lesões) e o tempo de evolução clínica até o diagnóstico e início do tratamento variou de um a 240 meses (mediana de 2,5 meses). Com relação aos resultados dos exames imunológicos, 10 pacientes (100%) apresentaram resultado de IDRМ positiva com valores variando de 10 mm a 36 mm (mediana de 14 mm) e seis pacientes (60%) apresentaram reatividade sorológica ao teste de ELISA.

O grupo Não Respondedores foi constituído por 28 pacientes, sendo 9 mulheres e 19 homens, com idades variando entre 18 e 62 anos (mediana de 34 anos). Desses, 18 pacientes adquiriram a LC no estado do Rio de Janeiro (subgrupo **NR_{RJ}**) e 10 em outros estados do Brasil (subgrupo **NR_{OE}**). No subgrupo **NR_{RJ}**, a idade variou de 18 a 53 anos (mediana de 27 anos), o número de lesões variou de uma a 15 (mediana de 1,5 lesões) e o tempo de evolução variou de um a seis meses (mediana de 2 meses). Com relação aos resultados dos exames imunológicos, 16 (88,8%) pacientes apresentaram resultado de IDRМ positiva com valores variando de oito a 27 mm (mediana de 15 mm), 9 pacientes (50%) apresentaram reatividade sorológica ao teste de ELISA e 3 (16,6%) apresentaram resultado indeterminado a esse teste. No subgrupo **NR_{OE}**, a idade variou de 25 a 62 anos (mediana de 34,5 anos), o número de lesões variou de uma a seis (mediana de 1 lesão) e o tempo de evolução variou de um a 62 meses (mediana de 11 meses). Com relação aos resultados dos exames imunológicos, oito pacientes (80%) apresentaram resultado de IDRМ positiva, com valores entre 11 e 30 mm (19,5 mm de mediana). Em um dos casos esse teste não foi realizado. Ao teste de ELISA, nove pacientes (90%) apresentaram reatividade sorológica.

Informações dos pacientes tais como: gênero, idade, origem geográfica, número de lesões, localização da lesão, dados da IDRМ e da sorologia (ELISA), considerando os subgrupos, são apresentados na Tabela 4. As Tabelas 5 e 6 apresentam informações individuais de cada paciente assim como, dados da DL₅₀ e do agrupamento em cluster das respectivas amostras estudadas.

Tabela 4- Dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo. VigiLeish, IPEC, FIOCRUZ, 2012.

Dados dos pacientes	Respondedores		Não Respondedores	
	Subgrupo R _{RJ} (n=16)	Subgrupo R _{OE} (n= 10)	Subgrupo NR _{RJ} (n= 18)	Subgrupo NR _{OE} (n= 10)
Nº de Homens/ Mulheres	6/10	4/6	10/8	9/1
Extremos da Idade (anos)	22 – 57 (40)	11 – 63 (42,5)	18 – 53 (27)	25 – 62 (34,5)
Extremos Nº de lesões	1 – 2 (1)	1 – 3 (2)	1 -15 (1,5)	1 – 6 (1)
Localização das lesões	1= 7 2= 9	1= 4 2= 6	1= 11 2= 7	1= 3 2= 7
T. Evol (meses)	1 – 3 (1)	1 – 240 (2,5)	1 – 6 (2)	1 – 62 (11)
Reatores àIDRM	15 (93,7%)	10 (100%)	16 (88,8%)	8 (80%)
Extremos da medida IDRM (mm)	7 – 60 (20)	10 – 36 (14)	8 – 27 (15)	11 – 30 (19,5)
Reatores ao ELISA	10 (62,5%)	6 (60%)	9 (50%)	9 (90%)

Subgrupo R_{RJ} - pacientes Respondedores oriundos do estado do Rio de Janeiro

Subgrupo R_{OE}- pacientes Respondedores oriundos de outros estados

Subgrupo NR_{RJ} - pacientes Não Respondedores oriundos do estado do Rio de Janeiro

Subgrupo NR_{OE}- pacientes Não Respondedores oriundos de outros estados

1- lesões localizadas em pernas e pés; 2- lesões em outras áreas do corpo

Valores entre parênteses indicam valores das medianas.

Tabela 5- Dados gerais do grupo Respondedores ao tratamento da LC com antimoniato de meglumina (5mg Sb^v/Kg/dia , composto por 26 pacientes. VigiLeish, IPEC, FIOCRUZ, 2012.

Código da amostra	Gênero	Idade (anos)	Área endêmica provável de aquisição da LC	Nº de lesões	Localização da lesão	Data do isolamento	Dados do diagnóstico		DL ₅₀	Cluster/Sub cluster
							IDRM (mm)	ELISA		
Casos oriundos do estado do Rio de Janeiro - subgrupo R_{RJ}										
554	M	28	Mun RJ- Santissimo	1	pé	20/04/1999	57	NR	6,0 ± 0,1	I/I
600	M	49	Mun RJ	2	t	17/08/2000	25	NR	3,9 ± 0,2	I/I
766	M	21	Mun RJ - Campo Grande	1	pé	20/09/2002	20	NR	4,8 ± 0,2	I/II
768	F	28	Mun RJ -Campo Grande	1	ms	07/10/2002	22	R	6,0 ± 0,3	I/II
789	F	41	Mun Paracambi	2	pé	26/11/2002	18	NR	2,0 ± 0,4	I/I
811	M	41	Mun RJ- Campo Grande	1	pé	17/02/2003	20	R	2,8 ± 0,1	I/II
983	F	40	Mun RJ- Campo Grande	1	pé	09/02/2004	7	NR	4,5 ± 0,2	I/II
986	M	40	Mun Com. Levy Gasparian	1	ms	03/03/2004	30	R	4,8 ± 0,2	I/II
133	F	46	Mun RJ- Campo Grande	1	ms	25/11/2004	60	NR	3,0 ± 0,0	I/II
299	F	35	Mun São Fidélis	1	t	21/12/2005	7	R	4,2 ± 0,3	I/I
469	F	44	Mun de São Fidélis	1	t	28/12/2005	23	NR	4,5 ± 0,1	I/I
317	F	42	Mun RJ- Bangu	1	mi	23/01/2006	20	R	1,9 ± 0,2	I/I
409	F	39	Mun RJ- Bangu	1	t	26/06/2006	POS	R	4,7 ± 0,2	I/I
501	F	22	Mun São Fidélis	1	pé	17/01/2007	16	R	3,4±0,08	I/I
1071	M	35	Mun RJ	1	ms	01/10/2007	NR	R	3,5 ± 0,1	I/II
1107	F	57	Mun RJ-Taquara	1	t	30/01/2008	25	NR	2,4 ± 0,2	I/I

Código da amostra	Gênero	Idade (anos)	Área endêmica provável de aquisição da LC	Nº de lesões	Localização da lesão	Data do isolamento	Dados do diagnóstico		DL ₅₀	Cluster/Sub cluster
							IDRM (mm)	ELISA		
Casos oriundos de outros estados - subgrupo R_{OE}										
622	M	49	Goiás	3	mi	29/11/2000	22	NR	5,1±0,05	I/I
765	F	49	Amazonas	2	c, mi	30/09/2002	10	NR	3,7±0,3	II/II
812	M	25	Amazonas	2	c, t,	22/01/2003	16	NR	4,5±0,4	II/I
891	M	23	Minas Gerais	1	ms	07/08/2003	11	ID	3,7±0,3	I/II
992	F	41	Espírito Santo	2	ms	03/04/2004	25	NR	4,6±0,2	I/I
095	F	44	Bahia	2	c	22/10/2004	36	R	5,4±0,1	I/II
420	F	27	Minas Gerais	1	mi	29/05/2006	POS	R	3,5±0,1	II/I
1132	F	63	Bahia	2	t, ms,c	14/04/2008	12	R	5,5±0,2	I/I
1450	F	11	Bahia	1	mi	08/02/2010	20	R	4,1 ± 0,1	II/II
1453	M	45	Bahia	3	t, ms	24/02/2010	12	R	3,7 ± 0,4	II/II

Legenda: R- reator; NR- não reator; ID- indeterminado, t- tórax; mi- membros inferiores; ms- membros superiores; c- cabeça; POS- positivo.

Os dados de reatividade ao teste de ELISA foram todos obtidos pré-tratamento.

Tabela 6- Dados gerais do grupo Não Respondedores, tratamento da LC com antimoniato de meglumina (5mg Sb^v/Kg/dia), composto por 28 pacientes

Código da amostra	Gênero	Idade (anos)	Área endêmica provável de aquisição da LC	Nº de lesões	Localização da lesão	Data do isolamento	Dados do diagnóstico		DL ₅₀	Cluster/ Sub cluster
							IDRM (mm)	ELISA		
Casos oriundos do estado do Rio de Janeiro - subgrupo NR_{RJ}										
952	M	43	Mun Casemiro de Abreu	2	mi, c	20/10/2003	12	R	5,7 ± 0,1	I/I
096	F	23	Mun RJ - Campo Grande	1	pé	31/11/2004	15	R	6,4 ± 0,3	II/I
145	M	40	Mun RJ - Campo Grande	2	pé	07/01/2005	11	R	4,6 ± 0,4	I/II
222	M	31	Mun RJ - Campo Grande	3	c	14/02/2005	11	R	4,5 ± 0,02	II/I
261	F	20	Mun Nova Iguaçu	2	ms;c	12/09/2005	27	ID	4,5 ± 0,02	II/I
291	F	21	Mun RJ- Campo	1	ms	07/12/2005	POS	R	5,9 ± 0,2	II/I
310	F	48	Mun de Saquarema	1	ms	25/01/2006	25	NR	6,3 ± 0,3	II/I
328	M	45	Mun de Carmo	15	c, t, mi, pé	20/02/2006	15	NR	3,1 ± 0,2	I/I
345	M	59	Mun RJ - Campo Grande	5	t; ms	22/03/2006	20	NR	5,4 ± 0,2	I/I
378	F	19	Mun RJ - Campo Grande	1	pé	17/04/2006	15	NR	5,2 ± 0,04	I/I
426	M	22	Mun de Resende	1	pé	02/08/2006	21	R	6,2 ± 0,06	I/II
475	F	43	Mun RJ - Campo Grande	2	pé	08/11/2006	20	ID	2,3 ± 0,1	I/II
489	M	19	Mun Eng. Paulo de Frontim	1	pé	11/12/2006	8	R	5,2 ± 0,4	I/I
530	M	18	Mun RJ - Campo Grande	1	pé	07/05/2007	8	NR	4,8 ± 0,1	I/I
1059	F	18	Mun RJ - Bangu	2	pé	27/08/2007	4	R	5,2 ± 0,04	II/I
1127	M	22	Mun Itaguaí	1	pé	19/05/2008	NR	NR	5,0 ± 0,1	II/II
1563	F	36	Mun Trajano de Moraes	4	ms	29/09/2010	POS	ID	5,4 ± 0,08	II/II
1517	M	53	Trajano de Moraes	1	ms	23/08/2010	POS	R	5,0 ± 0,3	I/I

Código da amostra	Gênero	Idade (anos)	Área endêmica provável de aquisição da LC	Nº de lesões	Localização da lesão	Data do isolamento	Dados do diagnóstico		DL ₅₀	Cluster/ Sub cluster
							IDRM (mm)	ELISA		
Casos oriundos de outros estados do Brasil- grupo NR_{OE}										
643	M	34	Minas Gerais	1	ms	04/05/1998	15	R	5,4 ± 0,2	II/I
689	M	62	Bahia	2	c	02/03/2001	30	R	3,8±0,02	II/II
737	F	51	Minas Gerais - Além Paraíba	1	mi	25/09/2002	19	R	4,8 ± 0,5	II/I
946	M	32	Manaus	2	c, t,	22/09/2003	22	R	6,1 ± 0,1	I/I
255	M	34	Amazonas	2	mi	19/09/2005	20	NR	5,2±0,1	II/II
389	M	50	Bahia	2	t, ms, c	15/05/2006	POS	R	5,7 ± 0,3	II/I
1030	M	46	Manaus	2	mi	24/04/2006	20	NR	6,1 ± 0,1	I/I
1284	M	35	Bahia	1	mi	02/03/2009	NR	R	5,8 ± 0,2	II/II
1300	M	27	Amazonas	1	mi	09/03/2009	IG	R	3,8 ± 0,2	II/I
1611	M	25	Bahia	3	t, ms	14/03/2011	POS	R	4,8 ± 0,1	I/I

Legenda: R- reator; NR- não reator; ID- indeterminado, c- cabeça; t- tórax; mi- membros inferiores; ms- membros superiores; POS- positivo; IG- ignorado. Os dados de reatividade ao teste de ELISA foram todos obtidos pré-tratamento.

Buscando avaliar as diferenças nos resultados de IDRM, quando comparados os grupos Respondedores e Não Respondedores, independente do local de infecção, observamos que os valores de IDRM encontrados no grupo de Respondedores foram mais elevados quando comparados ao grupo de Não Respondedores ($p= 0,0301$) (Figura 6).

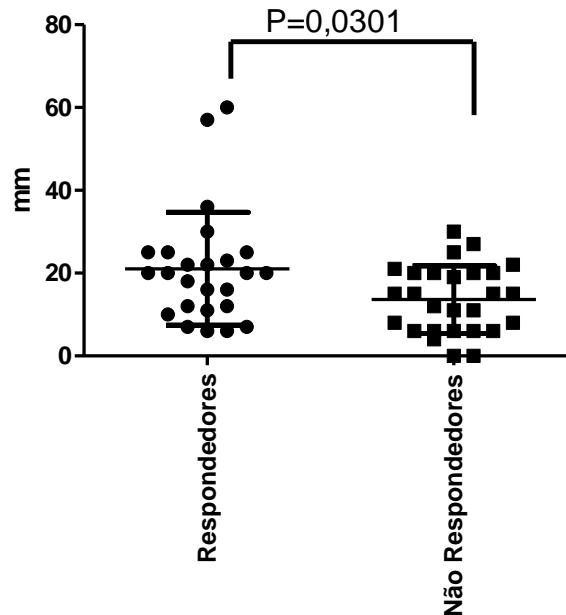


Figura 6- Apresentação gráfica da dispersão dos valores da intradermorreação de Montenegro (IDRM) para os pacientes do grupo Respondedores e do grupo Não Respondedores ao tratamento da LC com antimoniato de meglumina (5mg Sb^v/kg/dia).

Resultados semelhantes foram obtidos quando comparados os pacientes Respondedores e Não Respondedores ao tratamento cuja infecção foi adquirida no estado do Rio de Janeiro (subgrupos R_{RJ} e NR_{RJ}) ($P= 0,0294$). O mesmo, não foi observado quando foram comparados os subgrupos que adquiriram a infecção em outros estados (R_{OE} e NR_{OE}) ($P= 0,5438$). (Figuras 7a e 7b)

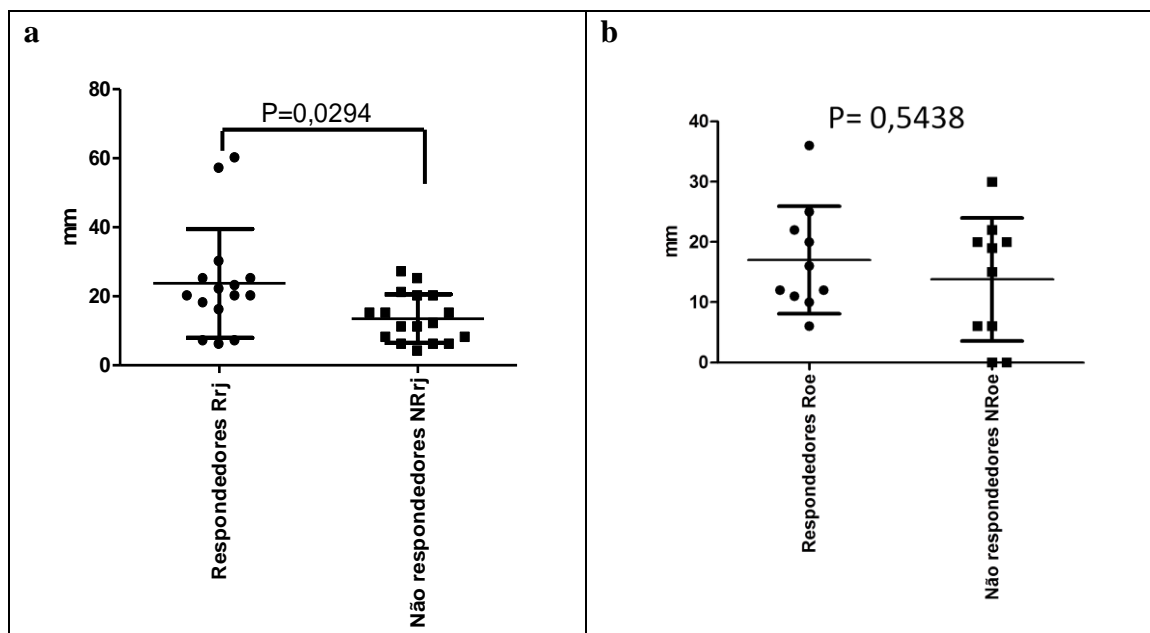


Figura 7- Apresentação gráfica da dispersão dos valores da intradermorreação de Montenegro (IDRM). a: pacientes do subgrupo R_{RJ} (Respondedores do Rio de Janeiro) e NR_{RJ} (Não Respondedores do Rio de Janeiro); b: pacientes do subgrupo R_{OE} (Respondedores de outros estados) e NR_{OE} (Não Respondedores de outros estados).

O número de lesões também foi analisado considerando os grupos Respondedores e Não Respondedores. Quando a comparação foi feita independente do local de infecção não observamos diferenças expressivas entre os grupos (gráfico não apresentado). No entanto, quando comparamos os pacientes do Rio de Janeiro, constatamos que os Não Respondedores, apresentaram maior número de lesões do que os Respondedores, com diferença significativa entre os subgrupos ($P = 0,0163$). Já entre os pacientes oriundos de outros estados não pudemos observar diferenças importantes ($P = 0,3933$). (Figura 8 a e b).

Com relação ao tempo de evolução da doença, não encontramos diferenças expressivas entre os grupos e subgrupos (gráfico não apresentado).

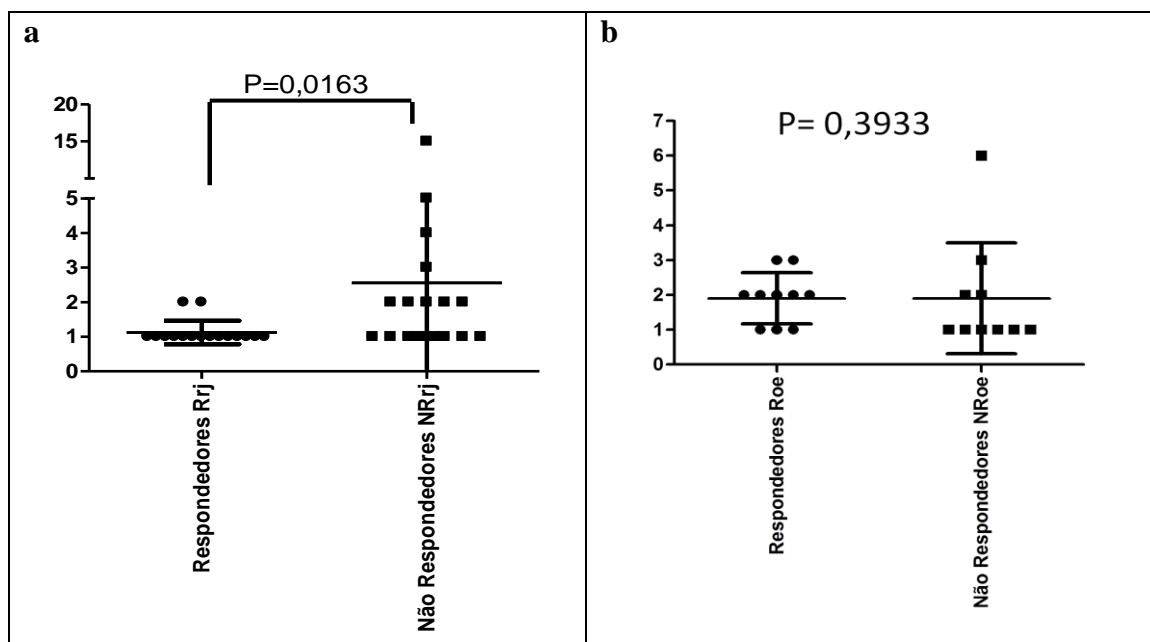


Figura 8- Apresentação gráfica da dispersão dos valores de número de lesões. **a:** pacientes do subgrupo R_{RJ} (Respondedores do Rio de Janeiro) e NR_{RJ} (Não Respondedores do Rio de Janeiro); **b:** pacientes do subgrupo R_{OE} (Respondedores de outros estados) e NR_{OE} (Não Respondedores de outros estados). [deixar claro no gráfico que os valores da ordenada são número de lesões]

5.2 . Análise das amostras de *L. braziliensis*

5.2.1. Níveis de sensibilidade *in vitro* ao antimoniato de meglumina

Nas amostras obtidas dos pacientes Respondedores oriundos do estado do Rio de Janeiro (subgrupo R_{RJ}), a DL_{50} variou de 1,9 a 6,0 mg/mL (média de $3,9 \pm 1,2$ mg/mL). Já no subgrupo de pacientes Não Respondedores oriundos desse mesmo estado (NR_{RJ}) os valores da DL_{50} variaram de 2,3 à 6,4 mg/mL (média de $5,03 \pm 1$ mg/mL). Os ensaios com as amostras dos pacientes dos outros estados a DL_{50} variou 3,5 a 5,5 mg/mL para o subgrupo R_{OE} (média de $4,3 \pm 0,7$ mg/mL) e de 3,8 a 6,1 mg/mL para o subgrupo NR_{OE} (média de $5,15 \pm 0,84$ mg/mL) (Tabela 7).

Tabela 7- Valores da DL₅₀ (mg/mL) obtido em ensaios in vitro para formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* após exposição à diferentes concentrações de antimoniato de meglumina, considerando amostras isoladas de pacientes Respondedores (subgrupos R_{RJ} e R_{OE}) e Não Respondedores (subgrupos NR_{RJ} e NR_{OE}) ao tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina (5mg Sb^V/kg/dia).

Amostras obtidas de pacientes oriundos do estado do Rio de Janeiro DL ₅₀ (mg/mL)				Amostras obtidas de paciente oriundos do outros estados do BrasilDL ₅₀ (mg/mL)			
Código R _{RJ}	DL ₅₀ R _{RJ}	Código NR _{RJ}	DL ₅₀ NR _{RJ}	Código R _{OE}	DL ₅₀ R _{OE}	Código NR _{OE}	DL ₅₀ NR _{OE}
768	6,0 ± 0,3	222	4,5 ± 0,02	1453	3,7 ± 0,4	389	5,7 ± 0,3
983	4,5 ± 0,2	1059	5,2 ± 0,04	1450	4,1 ± 0,1	1611	4,8 ± 0,1
1071	3,5 ± 0,1	096	6,4 ± 0,3	1132	5,5±0,2	946	6,1 ± 0,1
133	3,0 ± 0,0	1127	5,0 ± 0,1	622	5,1±0,05	737	4,8 ± 0,5
766	4,8 ± 0,2	952	5,7 ± 0,1	992	4,6±0,2	1300	3,8 ± 0,2
986	4,8 ± 0,2	261	4,5 ± 0,02	891	3,7±0,3	643	5,4 ± 0,2
554	6,0 ± 0,1	145	4,6 ± 0,4	812	4,5±0,4	1030	5,4 ± 0,3
789	2,0 ± 0,4	1517	5,0 ± 0,3	095	5,4±0,1	1284	5,8 ± 0,2
501	3,4 ± 0,08	489	5,2 ± 0,4	765	3,7±0,3	689	3,8±0,02
469	4,5 ± 0,1	328	3,1 ± 0,2	420	3,5±0,1	255	5,2±0,1
1107	2,4 ± 0,2	378	5,6 ± 0,2				
299	4,2 ± 0,3	345	5,4 ± 0,2				
409	4,7 ± 0,2	530	4,8 ± 0,1				
811	2,8 ± 0,1	426	6,2 ± 0,06				
600	3,9 ± 0,2	1563	5,4 ± 0,08				
317	1,9 ± 0,2	475	2,3 ± 0,1				
		310	6,3 ± 0,3				
		291	5,9 ± 0,2				

Nas figuras 9 e 10 são apresentados os gráficos relacionados à curva do percentual de inibição para as amostras dos subgrupos R_{RJ} e NR_{RJ} , respectivamente, onde a DL_{50} é indicada através do ponto de interseção da curva com o valor que indica 50% de inibição (eixo Y) com a respectiva concentração do antimoniato de meglumina (eixo X). Os valores extremos em cada grupo são apresentados pelas setas. Para o subgrupo R_{RJ} , os valores extremos foram: 1,9 mg para amostra 317 e 6,0 mg/mL para as amostras 554 e 768 (média de $3,9 \pm 1,2$ mg/mL). No subgrupo NR_{RJ} , os valores extremos foram: 2,3 mg/mL obtido com a amostra 475 e 6,4 mg/mL obtido para a amostra 096 (média de $5,03 \pm 1$ mg/mL).

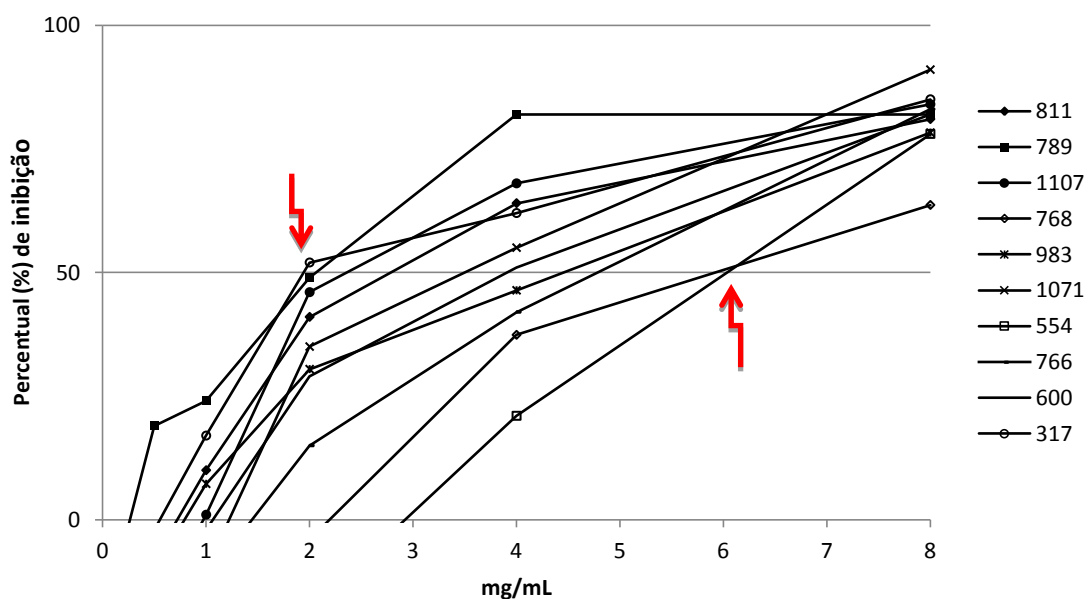


Figura 9- Identificação gráfica dos valores da DL_{50} de formas promastigotas de *L. braziliensis* de dez amostras representativas do grupo de pacientes Respondedores do estado do Rio de Janeiro, expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina, no intervalo de 24 horas. A DL_{50} é indicada através do ponto de interseção da curva com o valor que indica 50% de inibição (eixo Y) com a respectiva concentração do antimoniato de meglumina (eixo X). Os valores extremos máximo e mínimo, em cada grupo, são apresentados pelas setas.

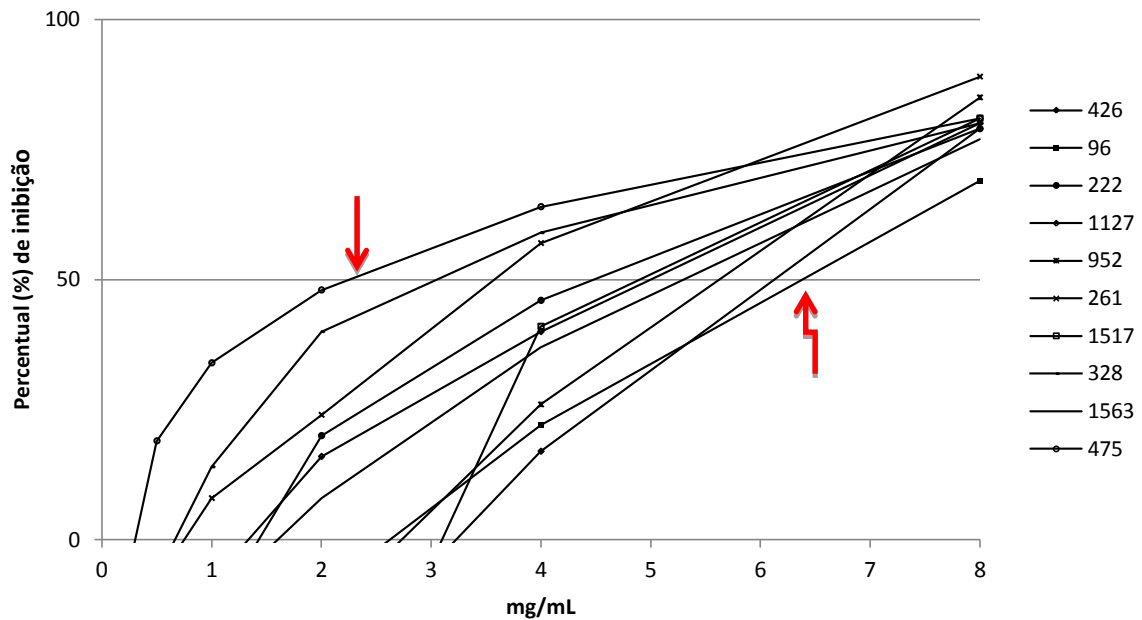


Figura 10- Identificação gráfica dos valores da DL_{50} de formas promastigotas de *L. braziliensis* de dez amostras representativas do grupo de pacientes Não Respondedores oriundos do estado do Rio de Janeiro, expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina, no intervalo de 24 horas. A DL_{50} é indicada através do ponto de interseção da curva com o valor que indica 50% de inibição (eixo Y) com a respectiva concentração do antimoniato de meglumina (eixo X). Os valores extremos máximo e mínimo, em cada grupo, são apresentados pelas setas.

Nas figuras 11 e 12 são apresentados os gráficos relacionados à curva do percentual de inibição para as amostras dos subgrupos R_{OE} e NR_{OE} , respectivamente. O subgrupo R_{OE} apresentou os seguintes valores extremos: 3,5mg/mL obtido com a amostra 420 e 5,5 mg/mL para a amostra 1132. Identificamos como valores extremos da DL_{50} das amostras do subgrupo NR_{OE} : 3,8mg/mL obtido com as amostras 689 e 1330 e 6,1 mg/mL para a amostra 946.

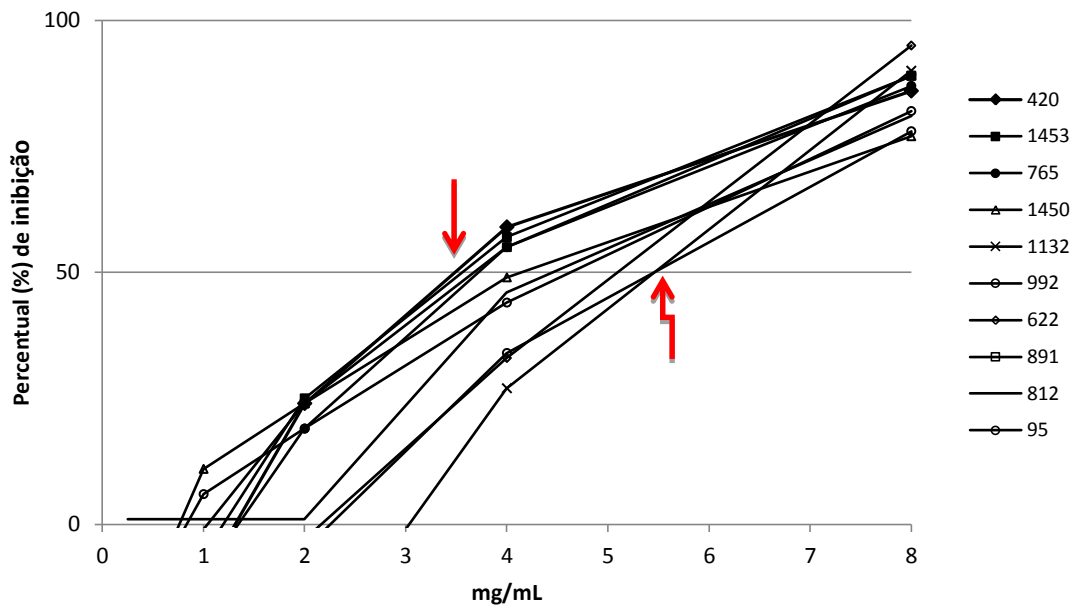


Figura 11- Identificação gráfica dos valores da DL_{50} de formas promastigotas de *L. braziliensis* das amostras do grupo de pacientes Responder, oriundos de outros estados, expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina, no intervalo de 24 horas. ADL_{50} é indicada através do ponto de interseção da curva com o valor que indica 50% de inibição (eixo Y) com a respectiva concentração do antimoniato de meglumina (eixo X). Os valores extremos máximo e mínimo, em cada grupo, são apresentados pelas setas.

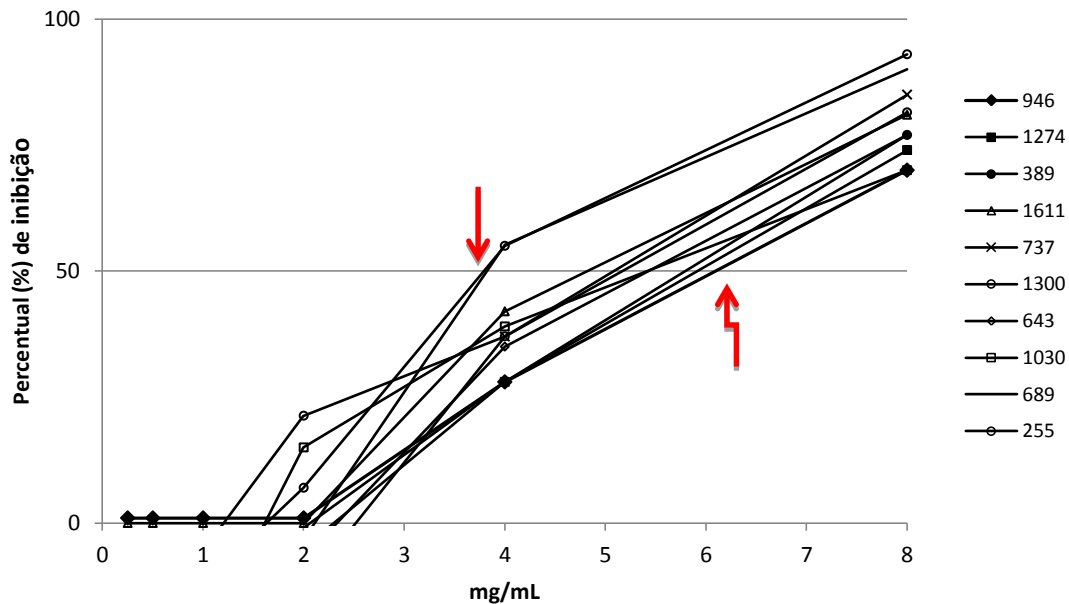


Figura 12- Identificação gráfica dos valores da DL_{50} de formas promastigotas de *L. braziliensis* das amostras do grupo de pacientes Não Responder oriundos de outros estados, expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina, no intervalo de 24 horas. A DL_{50} é indicada através do ponto de interseção da curva com o valor que indica 50% de inibição (eixo Y) com a respectiva concentração do antimoniato de meglumina (eixo X). Os valores extremos máximo e mínimo, em cada grupo, são apresentados pelas setas.

Utilizando o teste T de Student, avaliamos a diferença entre os valores médios da DL_{50} comparando inicialmente amostras do grupo Respondedores (média $4,08 \pm 1,10$ mg/mL) com amostras do grupo Não Respondedores (média $5,07 \pm 0,96$ mg/mL), obtendo valores significativos para a diferença dos valores da DL_{50} entre os grupos ($P=0,0007$) (Figura 13).

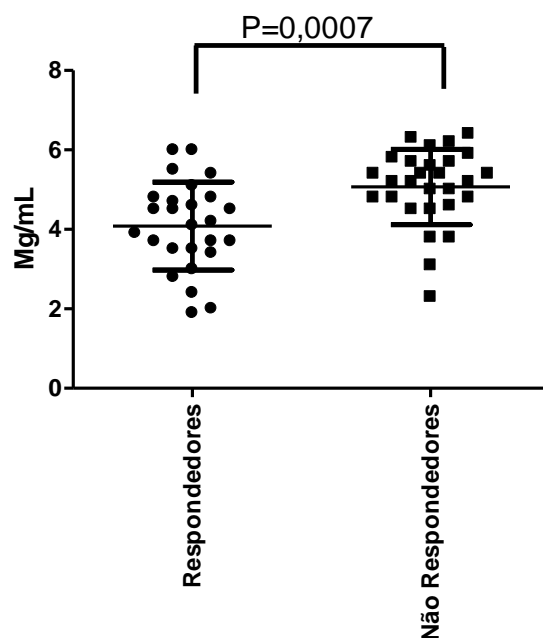


Figura 13- Apresentação gráfica da dispersão dos valores de DL_{50} comparando as amostras do grupo Respondedor e amostras do grupo Não Respondedor.

Quando os subgrupos foram analisados separadamente, também observamos significância estatística entre os valores da DL_{50} entre os grupos. Obtivemos valores de $P=0,0054$ para as amostras dos subgrupos R_{RJ} e NR_{RJ} (Figura 14a) e de $P=0,0445$ para as amostras dos subgrupos R_{OE} e NR_{OE} (Figura 14b).

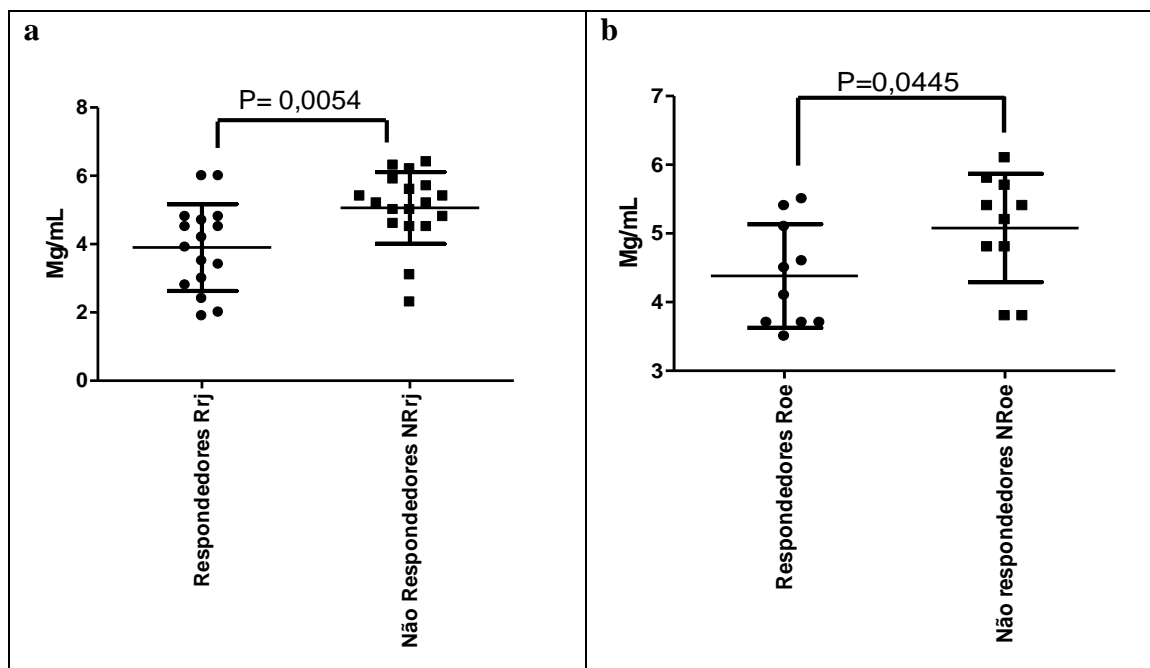


Figura 14- Apresentação gráfica da dispersão dos valores de DL_{50} comparando as amostras do subgrupo R_{RJ} e amostras do subgrupo NR_{RJ} (a) e amostras do subgrupo R_{OE} e amostras do subgrupo NR_{OE} (b).

Quando comparamos as amostras de *L. braziliensis* obtidas de pacientes do grupo Respondedores do Rio de Janeiro (subgrupo R_{RJ}) com amostras de Respondedores de outros estados (subgrupo R_{OE}), não pudemos encontrar diferença significativa ($P= 0,3422$). O mesmo se manteve quando amostras do grupo Não Respondedores (subgrupos NR_{RJ} e NR_{OE}) foram comparados entre si ($P= 0,9616$) (Figura 15a e 15b).

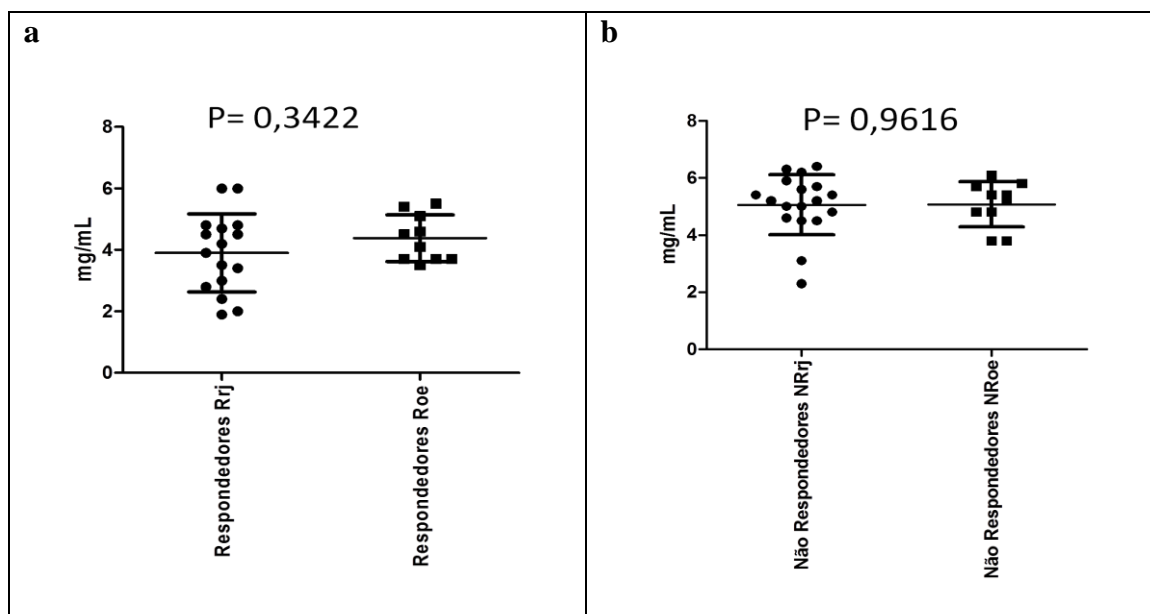


Figura 15- Apresentação gráfica da dispersão dos valores de DL_{50} comparando as amostras de pacientes Respondedores do Rio de Janeiro e de outros estados (a) e amostras de pacientes Não Respondedores do Rio de Janeiro e de outros estados (b).

5.2.2. Ensaio da PCR específica

Após a PCR específica para o complexo *Leishmania braziliensis*, empregando alvos dirigidos para região variável dos minicirculos do kDNA, 100% das amostras (n=54) de *L. braziliensis* selecionadas para o estudo, apresentaram produto de amplificação com 750 pb como esperado.

A Figura 16 mostra o resultado da PCR com 10 das 54 amostras do estudo (grupo representativo). Estes produtos foram analisados juntamente com o marcador de tamanho molecular (DNA-Ladder 100 pb), que forneceu uma base para estabelecer o tamanho em pares de base do produto de amplificação gerado pelo iniciador.

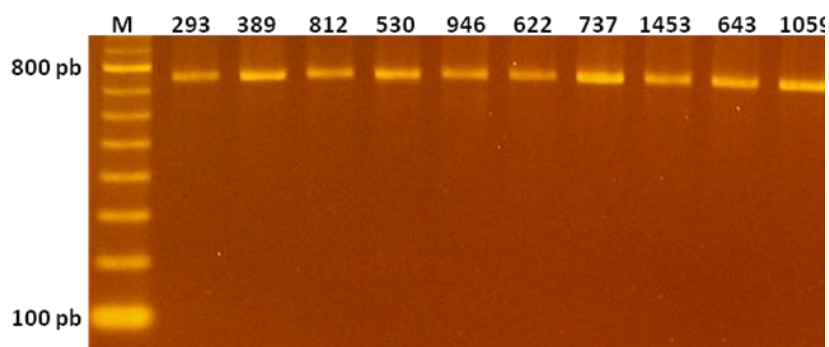


Figura 16- Eletroforese em gel de agarose a 1,5% mostrando os produtos amplificados de amostras representativas do estudo, após a PCR com os iniciadores B1/B2. M: marcador molecular DNA Ladder 100 pb; Linhas de 2 a 10 no gel: amostras de pacientes.

5.2.3. Avaliação da heterogeneidade genética intrapopulacional de *L. braziliensis*

Pelos perfis polimórficos obtidos com a técnica de LSSP-PCR foi possível evidenciar a variabilidade genética intrapopulacional nas amostras de *L. braziliensis*, identificando perfis com diferentes graus de complexidade, considerando os grupos e subgrupos.

As análises foram feitas delimitando uma faixa compreendida entre 300 e 800 pb onde as amostras compartilhavam fragmentos majoritários em comum (Figura 17).

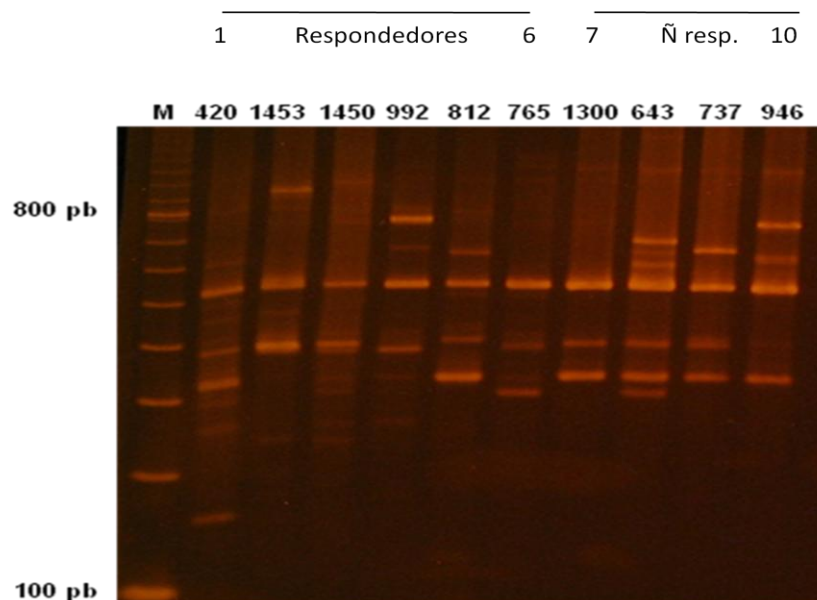


Figura 17- Perfis gerados por LSSP-PCR mostrando a variabilidade genética de 10 amostras de *L. braziliensis*, representativas do estudo, considerando os grupos A e B. M: marcador molecular DNA Ladder 100 bp; Linhas de 1 a 6 no gel: códigos das amostras de pacientes Respondedores ao tratamento; Linhas de 7 a 10 no gel: códigos das amostras de pacientes Não Respondedores ao tratamento.

Na análise fenética, realizada considerando as amostras dos grupos Respondedores e Não Respondedores, na sua totalidade, observamos a formação de dois principais clusters (Cluster I e Cluster II) que ligam-se entre si por um coeficiente de similaridade de 0.70. A amostra de nº 946 obtida de paciente do subgrupo NR_{OE} mostrou-se geneticamente mais diferenciada, ligando-se ao subcluster 1 por um coeficiente de similaridade de 0.77, dividindo 77% de caracteres em comum com as amostras do subcluster 1.

Quando avaliamos amostras de pacientes procedentes do estado do Rio de Janeiro com o de outros estados, observamos que não houve estruturação entre os grupos Respondedores e Não Respondedores. Um total de 46.4% (13/28) dos Não Respondedores foi agrupado no cluster I e 53.6% (15/28) no cluster IIA. Figura 18 mostra o dendrograma baseado nos perfis de amplificação das 54 amostras estudadas por LSSP-PCR, utilizando-se o coeficiente de Simple Matching e algoritmo de agrupamento UPGM.

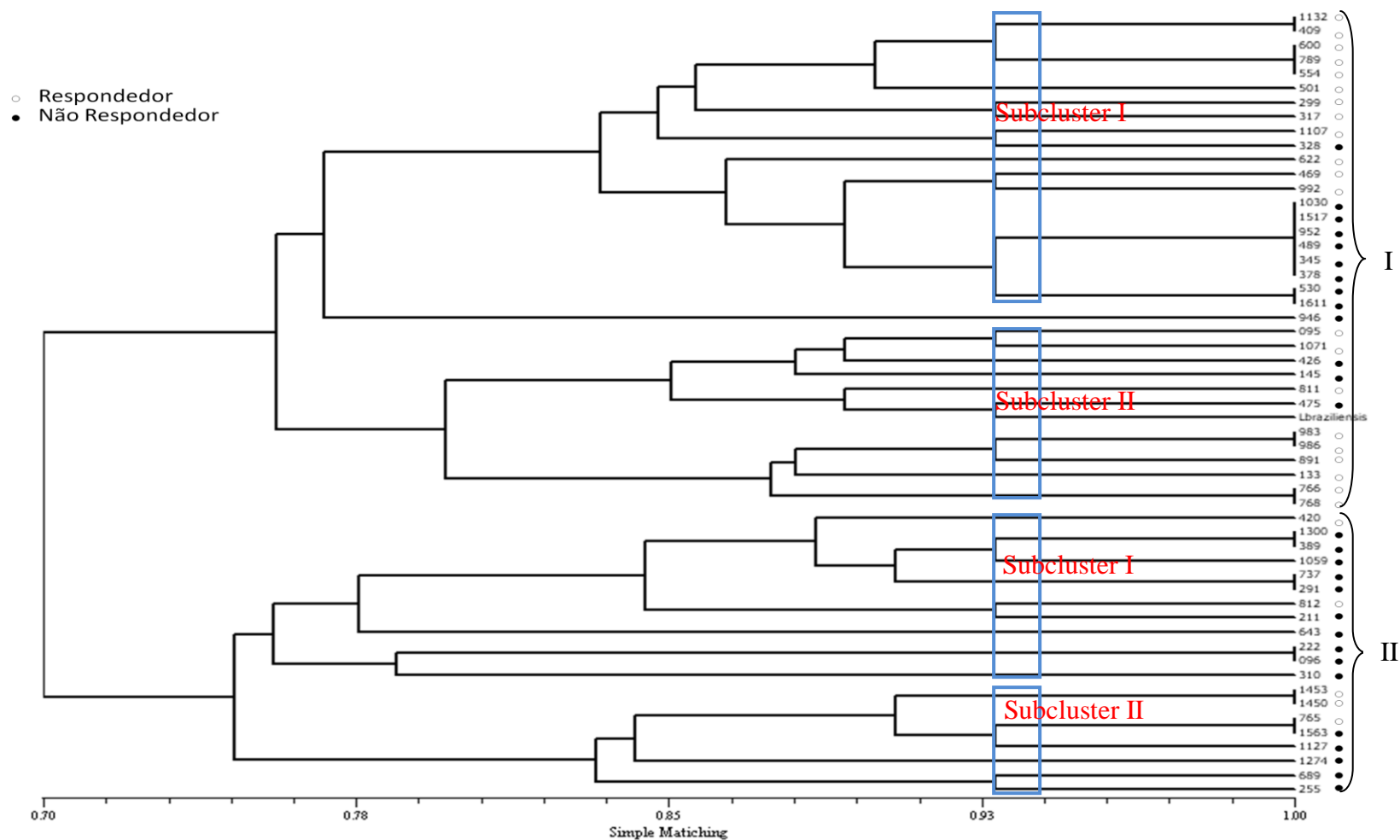


Figura 18- Análise fenética utilizando-se o coeficiente de concordância simples (Simple Matching) e o algoritmo de UPGMA mostrando o agrupamento dos perfis de amplificação por LSSP-PCR em amostras de *L. braziliensis* isoladas de pacientes com diferentes desfechos após tratamento da LC com o antimoniato de meglumina. Dois clusters (I e II) foram identificados. *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) constitui a amostra de referência utilizada.

Para a análise fenética, consideramos agora as amostras isoladas de pacientes do Rio de Janeiro, contemplando os subgrupos R_{RJ} e NR_{RJ} o dendrograma gerado identificou a formação de 3 clusters. O cluster I foi composto por 12 amostras, das quais 67% (8 amostras) eram de pacientes Respondedores e 33% (4 amostras) de pacientes Não Respondedores. O cluster II foi composto por 14 amostras, das quais 57% (8 amostras) eram de pacientes Respondedores e 43% (6 amostras) de pacientes Não Respondedores Já o cluster III agrupou 8 amostras das quais 100% eram de pacientes Não Respondedores. O dendrograma gerado com esta análise é mostrado na Figura 19.

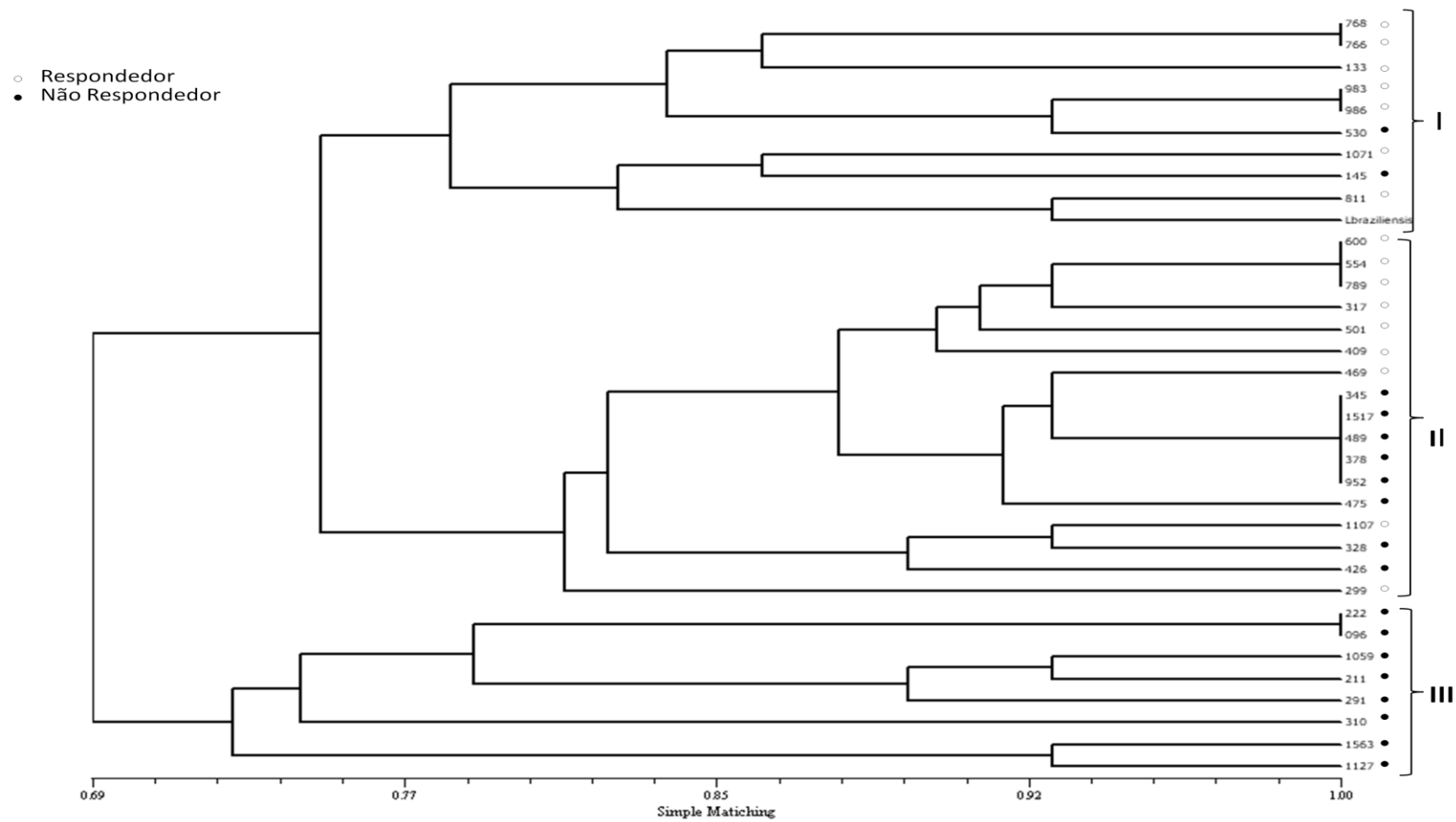


Figura 19- Análise fenética utilizando-se o coeficiente de concordância simples (Simple Matching) e o algoritmo de UPGMA mostrando o agrupamento dos perfis de amplificação por LSSP-PCR em amostras de *L. braziliensis* isoladas de pacientes oriundos do estado do Rio de Janeiro, com diferentes desfechos após tratamento da LC com o antimoníato de meglumina.

6. Discussão

Os antimoniais pentavalentes são utilizados no tratamento de todas as formas de leishmaniose há décadas e apesar da sua eficácia, uma grande variabilidade de respostas é relatada, observando-se desde a cura clínica até a ocorrência de recidivas e falhas terapêuticas (Minodier & Parola, 2007). Aspectos dos parasitos podem contribuir para os diferentes desfechos e, o nosso trabalho vem contribuir com informações relacionadas à heterogeneidade genética e níveis de sensibilidade de um grupo de amostras de *L. braziliensis* isoladas de casos Respondedores e Não Respondedores ao tratamento pelo antimoniato de meglumina.

Para a realização de estudos envolvendo os parasitos, é de fundamental importância não só o isolamento de *Leishmania*, mas também a sua recuperação após a criopreservação. Embora exista uma perda esperada de amostras criopreservadas, a razão para este fato ainda é pouco discutida na literatura. Nossos resultados corroboram com o estudo de Coutinho et al., (2011) que neste mesmo banco, relatou uma perda de cerca de 13,5% em amostras que foram congeladas por períodos maiores que cinco anos. Tais dados sugerem que amostras criopreservadas por longos períodos possam não ser recuperadas, havendo a necessidade de avaliações periódicas dessas amostras.

Um ponto também necessário nesse tipo de estudo e, considerado aqui, foi a uniformização da fase de crescimento dos parasitos utilizados nos ensaios. Utilizamos formas promastigotas de fase infectiva e em fase estacionária de crescimento, já que o potencial infectivo de amostras de *Leishmania* é uma característica fundamental que deve ser estabelecida quando se propõe avaliar os níveis da sensibilidade *in vitro* (Bates et al, 1988). A expressão de diferentes proteínas de superfície desses parasitos está relacionada com determinadas fases do crescimento e, por essa razão, a garantia da infectividade das amostras estudadas foi necessária. Além disso, buscamos uniformizar todas as etapas que envolveram tais ensaios, procurando controlar variáveis relacionadas ao processo de multiplicação dos parasitos em meio de cultura. Todos os ensaios foram realizados com amostras até a 5ª passagem, semeadas sempre no mesmo tipo de garrafa e com o mesmo volume de meio de cultura. A fase estacionária empregada para as amostras de *L. braziliensis* correspondeu ao 3º ou 4º dias do crescimento, como já preconizada em outros estudos. Assim como foram padronizadas também todas as etapas para realização da técnica de PCR, com medição do

comprimento de corrida, preparo dos géis e reações padronizadas para assegurar a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (Moreira et al., 1998; Miranda, 2011; Oliveira et al., 2012). Todos esses passos mencionados acima nem sempre são descritos e discutidos nas publicações, mas garantem a confiabilidade nos resultados aqui obtidos.

Embora a eletroforese de isoenzimas seja considerada padrão-ouro na tipagem de parasitos do gênero *Leishmania*, o resultado é obtido pela comparação do padrão eletroforético com amostras de referência. As amostras caracterizadas como *L. guyanensis* foram isoladas de pacientes pertencentes ao grupo NR_{OE}, os quais provavelmente adquiriram a infecção na cidade de Manaus (AM), onde *L. guyanensis* é endêmica (Camara-Coelho et al., 2011). Outras quatro amostras componentes do estudo não puderam ser identificadas por esse método. Isso pode ter ocorrido pelo fato de não termos utilizado todas as amostras de referência representantes do subgênero *Viannia* nos ensaios de caracterização. Sabemos que espécies como *L. naiffi*, *L. lainsoni* e *L. shawi* são encontradas na região Amazônica (Tojal da Silva et al., 2006), sendo uma das possibilidades para as duas amostras não identificadas que foram isoladas de pacientes que possivelmente adquiriram a infecção na região amazônica. Outra possibilidade para este resultado pode estar relacionado à elevada variabilidade genética de algumas espécies, as quais podem apresentar inúmeras variantes isoenzimáticas. Na região amazônica já foi relatado um elevado polimorfismo intra-específico de *L. braziliensis* (Cupolillo et al., 1998). Neste caso, é importante ressaltar que o número de sistemas enzimáticos do estudo deve ser ampliado (Cupolillo et al., 2003; Rocha-Lima, 2009) e outras técnicas utilizadas para tipagem (Pacheco et al., 1997; Baptista et al., 2009). Embora tais amostras tenham sido retiradas de nosso estudo, a sua caracterização está em andamento através da técnica de RFLP, cujos resultados preliminares demonstraram que essas quatro amostras pertencem ao complexo *L. braziliensis*, reforçando as observações citadas acima. Portanto, esses resultados ressaltam dois pontos relevantes: i) a importância da caracterização etiológica para realização destes estudos e, ii) o monitoramento das espécies de *Leishmania* que podem estar sofrendo migrações, conforme o deslocamento humano e instalando-se em outras regiões.

O esquema de baixa dose de antimonial pentavalente (5mg Sb^v/kg/dia) vem sendo empregado com boa eficácia e pouca toxicidade há vários anos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ) (Oliveira-Neto et al., 1996; Oliveira-Neto et al., 1997 a; Oliveira-Neto et al., 1997 b; Schubach et al., 2005). Apesar de tais esquemas apresentarem boa resposta terapêutica, em torno de 80% dos casos,

como visto no VigiLeish, no grupo de pacientes selecionados para o nosso estudo, uma parcela de casos, submetidos ao mesmo esquema, apresentou má resposta ao tratamento.

Alguns estudos têm aventado hipóteses de que os casos de falha terapêutica e recidivas possam estar relacionados às características genéticas das espécies de *Leishmania* de uma dada região. No Rio de Janeiro, uma taxa em torno de 16% de reativação da LTA tem sido descrita (Oliveira-Neto et al, 1997). Variáveis como idade, esquema terapêutico, forma clínica, número de lesões, tempo de evolução da doença, presença de co-morbidades estão entre as variáveis que podem influenciar tal resposta (Rodrigues et al., 2006), dados relacionados ao esquema terapêutico foram controlados, incluindo o fármaco, via de administração e número de doses recebidas. Da mesma forma, não foram incluídos pacientes com co-morbidades.

Os dados clínicos do grupo de pacientes Respondedores estavam de acordo com o padrão clássico apresentado pela LTA e foi considerado na seleção desse grupo. Com relação ao gênero, constatamos que o grupo de pacientes Respondedores apresentou maior número do gênero feminino, sendo o inverso observado nos grupos de pacientes Não Respondedores, onde os homens predominaram. Esses dados podem sugerir que as mulheres apresentam, em média, melhor resposta ao tratamento do que os homens ou mesmo que estas têm melhor adesão ao tratamento, no entanto, o grupo estudado pode ter sofrido um viés de seleção, já que consideramos apenas os pacientes cujas amostras de *Leishmania* foram recuperadas. Outros estudos, considerando a amostragem total do banco do VigiLeish estão sendo conduzidos. A variação nas idades dos pacientes estudados deu-se, principalmente no grupo ROE. Observamos uma grande variação no tempo de evolução das lesões entre os grupos de outros estados, o que pode ser devido à disponibilidade de atendimento médico específico e diagnóstico.

No entanto, apesar de não termos encontrado diferença estatisticamente significativa, o tempo de evolução das lesões cutâneas foi superior no grupo de Não Respondedores. Sendo nossos resultados inversos ao relatado no estudo de Antônio (2012). O grupo de pacientes Não Respondedores apresentou tempo de evolução maior, com grande variação de valores, atingindo até 63 meses. Já o grupo de Respondedores apresentou tempo de evolução entre 2 e 4 meses após a infecção. Isto pode ser devido a disponibilidade de atendimento médico específico e diagnóstico mais precoce no Rio de Janeiro, em especial como é oferecido no serviço do VigiLeish. Esse dado também sugere que o tempo de evolução da doença possa interferir na resposta terapêutica.

No IPEC, dados sorológicos obtidos pelo ELISA têm sido utilizados não só para

o diagnóstico da LTA, mas principalmente na avaliação do prognóstico dos pacientes durante o tratamento e após cura clínica (Mouta-Confort, 2009). Com relação aos resultados sorológicos obtidos para os pacientes estudados, observamos que não houve diferenças entre os grupos Respondedores e Não Respondedores, nem mesmo quando comparamos os pacientes do Rio de Janeiro e de outros estados. Cerca de 50% dos pacientes, em ambos os grupos, foram reatores ao ELISA. Quando avaliamos esse dado, considerando os subgrupos, constatamos que o subgrupo NR_{OE} apresentou maior percentual de pacientes reatores (90%), no entanto, esse dado não apresentou significância estatística, quando comparamos tal percentual com os outros subgrupos, indicando que avaliações dicotômicas (reator e não reator) não são bons parâmetros para comparações com o desfecho terapêutico e que talvez a intensidade das densidades ópticas (DOs) pudesse trazer informações mais importantes nesse contexto, como descrito por Mouta-Confort (2009).

Os resultados dos ensaios envolvendo a avaliação de sensibilidade *in vitro* de amostras de *Leishmania* também estão condicionados a fatores relacionados à espécie do parasito e à forma evolutiva, se promastigotas ou amastigotas. Com relação à forma, estudos têm mostrado que tanto promastigotas como amastigotas são sensíveis aos antimoniais (Azeredo-Coutinho et al, 2007), embora formas promastigotas necessitem de doses mais elevadas do fármaco. As doses empregadas em nosso estudo tomaram por base a padronização e os resultados obtidos por Miranda (2011) e apresentaram variação de valores da DL₅₀ similares para as amostras de pacientes Respondedores e Não Respondedores. Entretanto, quando avaliamos as médias, encontramos valores significativamente menores para as amostras de pacientes Respondedores do que para Não Respondedores. Portanto, amostras isoladas de pacientes Respondedores foram mais sensíveis ao antimonio de meglumina nos ensaios *in vitro*, tanto para o grupo do Rio de Janeiro, como para o grupo de outros estados. Esse dado sugere uma possível associação da sensibilidade e da boa resposta terapêutica da LC.

Os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, muitas vezes são extrapolados para correlacionar aspectos clínicos dos pacientes. Ouakad et al., (2011) em seu estudo, conseguiu demonstrar, que cepas consideradas resistentes ao antimonial pentavalente, na forma promastigota, desenvolvem em média duas vezes mais formas metacíclicas e correlacionou estes resultados à linhagens mais virulentas que produzem maior carga parasitária. Entretanto, na correlação à aspectos de resposta terapêutica, mais precisamente os casos de má resposta, é importante mencionar que vários fatores podem

influenciar tais resultados, cuja interpretação deve ser feita com cautela, antes de atribuir possível resistência parasitária às amostras com níveis de DL₅₀ elevada.

Dentre os fatores que podem influenciar na sensibilidade ao antimonio de meglumina está a origem geográfica das amostras de *Leishmania*. Considerando os nossos resultados, as diferenças nos valores médios de DL₅₀ entre amostras de *L. braziliensis* obtidas do Rio de Janeiro comparadas com amostras de *L. braziliensis* de outros estados não foram significantes, mostrando tendências de sensibilidade similares, embora as amostras de outros estados avaliadas tenham sido em menor número. Contrariamente, em estudo feito por Azeredo-Coutinho e seus colaboradores em 2007, a sensibilidade ao antimonio de meglumina de formas promastigotas de *L. braziliensis*, isoladas no Rio de Janeiro, foi semelhante a sensibilidade de *L. braziliensis* isoladas de outras localidades. Foi observado que a DL₅₀ das amostras de linhagens locais de *L. braziliensis* foram consideravelmente menores do que daqueles isolados de outras localidades, concluindo que as amostras circulantes no município do Rio de Janeiro seriam mais sensíveis ao antimonio de meglumina. Já em outro estudo, Zauli-Nascimento et al, (2010) encontraram níveis efetivos cerca de três vezes maiores para *L. braziliensis* que para *L. amazonensis*, sugerindo que as diferentes espécies de *Leishmania* possuem sensibilidade diferenciada nos ensaios *in vitro*. Entretanto, tais resultados não apresentaram qualquer correlação com a resposta terapêutica dos pacientes dos quais as amostras foram isoladas. Sobre esta última observação não podemos comentar, já que em nosso estudo utilizamos somente amostras identificadas como *L. braziliensis* para essa avaliação.

Da mesma forma, em nosso estudo, observamos que o grupo de Respondedores, independente de sua origem geográfica, apresentou valores da IDRМ significativamente maiores que o grupo de Não Respondedores, este resultado se mantém quando comparamos apenas os grupos com infecção adquirida no Rio de Janeiro, entretanto o mesmo perfil não se reproduz nos grupos de pacientes de outros estados. O baixo número de amostras analisadas de outros estados pode ter influenciado para que isto não ocorresse nos grupos de pacientes de outros estados. Este resultado parece ter associação com o estudo de Antônio (2012), que estudando aspectos da IDRМ em pacientes com LTA atendidos no IPEC, observou que pacientes que apresentaram falha terapêutica ao antimonio de meglumina, apresentavam reações de IDRМ menos intensas que pacientes que evoluíram para a cura clínica. Considerando nossos resultados, observamos que os valores médios da IDRМ foram significativamente

maiores no grupo de pacientes Respondedores ($p=0,0301$). Essa observação, de certa forma, corrobora os resultados obtidos com o grupo estudado por Antônio e seus colaboradores, e sugere que a IDRM possa ser um indicativo de resposta terapêutica da LC, onde a resposta imune do paciente parece colaborar para a eficácia do antimoniatado de meglumina.

A diversidade genética dos parasitos do gênero *Leishmania*, especialmente as pertencentes ao subgênero *Viannia* já foi apontada em vários estudos (Cupollilo et al., 1997; Cupollilo et al., 2003; Ishikawa et al., 2002) e pode estar relacionada com o envolvimento de diferentes hospedeiros (vertebrados e invertebrados) nos ciclos de transmissão. *Leishmania braziliensis* é um representante deste subgênero com elevada prevalência nas infecções humanas, sendo o conhecimento de sua heterogeneidade genética muito importante para a compreensão de aspectos que envolvem a interação parasito/hospedeiro. O estudo da variabilidade genética desses parasitos busca, principalmente, traçar possíveis correlações com as distintas formas clínicas, padrões de evolução da doença e, às respostas terapêuticas (Baptista et al, 2009; Oliveira, 2011). Nesse contexto, técnicas moleculares, baseadas na PCR são utilizadas e a escolha do alvo molecular é fundamental para que sejam obtidas informações adequadas. Em nosso estudo, utilizamos a técnica de LSSP-PCR também utilizada por outros autores nessa abordagem (Baptista et al., 2009; Baptista, 2012; Oliveira et al., 2011; Oliveira, 2011). Observamos que todas as amostras apresentaram a banda diagnóstica de 750 pb, correspondente a amplificação da região variável do minicírculo do kDNA de *L. braziliensis*, confirmando os resultados obtidos por isoenzimas. Cabe ressaltar que os iniciadores utilizados na técnica de PCR embora sejam específicos para diferentes espécies do complexo *L. braziliensis*, levaram em consideração a tipagem inicial por isoenzimas, descartando qualquer outra espécie de *Leishmania* do subgênero *Viannia* ou *Leishmania*.

Leishmania braziliensis é composta por populações de elevada heterogeneidade genética. Em nosso estudo, buscamos associar possíveis padrões genéticos com a resposta terapêutica apresentada pelos casos selecionados. Decuyper e seus colaboradores, em 2012 estudaram duas populações de *L. donovani* isoladas de casos do Nepal, visando observar a heterogeneidade genética nestas populações naturais de parasitos, sob a pressão do tratamento pelo antimonial pentavalente. O distinto perfil encontrado no seu estudo forneceu evidências de que mecanismos moleculares possam guiar o surgimento de fenótipo relacionado à resistência parasitária. Estudos já

levantaram hipóteses de que fatores relacionados ao estresse inerente ao ambiente natural dos parasitos, por exemplo, estresse oxidativo da célula hospedeira podem também influenciar esse mecanismo (Yardley et al., 2006; Ait-Oudhia et al., 2011; Perry et al., 2011). A exposição diferencial a tais fatores, teoricamente poderia resultar em alterações moleculares nos parasitos. No entanto, parece improvável aos pesquisadores, que diferenças ambientais tenham sido a força motriz na formação da heterogeneidade de linhagens resistentes nas amostras de parasitos estudadas, desde que as duas populações são originárias da mesma região endêmica e provavelmente tenham sido expostas a pressões ambientais similares. Baseados nestes achados, a equipe formulou a hipótese de que as diferenças no “background” genético foram a maior força motriz no desenvolvimento dos fenótipos heterogêneos de resistência. O “background” genético do parasito determina a capacidade intrínseca do mesmo de lidar com o estresse pelo antimonial, sendo essa capacidade intrínseca e variável entre populações genéticas distintas (Decuyper et al., 2012).

Observando os resultados gerados pela técnica de LSSP-PCR nas amostras estudadas, sem levar em conta a origem geográfica dos pacientes, observamos a formação de dois clusters principais, neles não observamos segregação quanto ao tipo de resposta terapêutica, embora o cluster II tenha concentrado maior número de amostras de casos Não Respondedores (16/20). Já quando ocorre a separação em subclusters, pequenos detalhes podem ser destacados. No subcluster I do Cluster I não observamos segregação quanto ao tipo de resposta, mas podemos constatar a presença de 13 amostras agrupadas com 100% de similaridade entre seus genes, entre as quais estão cinco amostras de pacientes Não Respondedores do Rio de Janeiro. Já no subcluster II, constatamos um agrupamento de amostras obtidas de pacientes Respondedores das quais 75% corresponde à pacientes do Rio de Janeiro (9/12). Nesse subcluster, também observamos o agrupamento de quatro amostras apresentando 100% de caracteres similares, sendo todas de pacientes do Rio de Janeiro. Esse resultado sugere que *L. braziliensis* circula nos hospedeiros em clones genéticos diferenciados. No subcluster I do cluster II observamos novamente a segregação, com amostras de pacientes Não Respondedores, totalizando 83,4% (10/12) das amostras. Aqui, evidenciamos a presença de seis amostras compartilhando 100% de caracteres similares, agrupadas duas a duas e no subcluster II temos 62,5% (5/8) de agrupamento de amostras de Não Respondedores que compartilham aproximadamente 83% de similaridade genética. Neste mesmo agrupamento temos quatro amostras que apresentam

compartilhamento de 100% de seu genoma idêntico.

Quando analisamos as amostras de pacientes do Rio de Janeiro separadamente, vimos que foi possível a separação de casos representativos do grupo Respondedores e Não Respondedores. O cluster I foi composto por 77,8% (7/9) de pacientes Respondedores, neste cluster, quatro amostras apresentaram 100% de similaridade. No cluster II, oito amostras apresentaram 100% de similaridade, mas não houve segregação por tipo de resposta ao tratamento, 52,9% (9/17) de amostras pertenciam ao grupo Respondedores. O cluster III foi composto exclusivamente por amostras de pacientes Não Respondedores que compartilham aproximadamente 72% de caracteres similares, este cluster reuniu duas amostras com 100% de similaridade.

É interessante notar que a maioria das amostras que se apresentaram agrupadas compartilhando 100% de similaridade genética, independente da origem geográfica, foram sempre pertencentes ao mesmo grupo (Respondedores ou Não Respondedores). Houve exceção de um caso, observado com uma amostra de paciente Não Respondedor do Rio de Janeiro (nº 1563) que ficou agrupada com uma amostra de paciente Respondedor de outros estados (nº 765) (Figura 18).

Todos esses resultados, obtidos através das análises moleculares, podem ser vistos na formação dos dendrogramas apresentados nos resultados deste estudo e demonstram a existência de grande variabilidade genética entre isolados de *L.braziliensis*, como já foi evidenciado em outros estudos. No entanto, podemos sugerir que a variabilidade de respostas terapêutica observada no grupo estudado, não está relacionada exclusivamente a esses padrões genéticos. Baptista et al., (2011) também não conseguiu agrupar padrões genéticos às amostras isoladas antes e após a terapêutica, nem tampouco a forma clínica apresentada pelo paciente (Baptista et al., 2009).

Ainda nesse contexto, a teoria da propagação clonal, proposta por Tibayrenc e colaboradores (1990), sugere a presença de genótipos predominantes, tanto em localidades particulares quanto em extensas áreas geográficas e por longos períodos de tempo. A estrutura populacional clonal é um modelo que reforça tanto a existência de elevada diversidade inter-espécies, como também de diferenças intra-espécies, podendo ter impacto clínico e epidemiológico. Embora as amostras de *L. braziliensis* circulantes no Rio de Janeiro sejam consideradas como uma população geneticamente homogênea (Lopes et al., 1984; Cupolillo et al., 2003), dados obtidos neste estudo, identificaram certa variabilidade genética nesta população. Isso pode ser devido à hipótese acima

descrita, ou mesmo, devido à técnica escolhida para essa análise, pois a LSSP-PCR constitui um marcador polimórfico (Baptista et al., 2009; Oliveira et al., 2010). É possível que a variabilidade intra-específica de populações circulantes nas áreas endêmicas de *L.braziliensis* possa influenciar na expressão clínica e prognóstica da LTA, no entanto, as espécies de *Leishmania* circulam na natureza, como um conjunto de sub-populações heterogêneas. A policlonalidade de algumas amostras, como resultado de um inóculo inicial heterogêneo (Pacheco et al., 1990) ou o acúmulo de múltiplas infecções independentes em indivíduos vivendo em áreas endêmicas (Saravia et al., 1990) tem sido relatada.

Empregando a técnica de LSSP-PCR com amostras de *L. infantum* isoladas de diferentes reservatórios, Alvarenga e colaboradores (2012) demonstraram que padrões genéticos dessa espécie estão relacionados com a origem do reservatório (humano ou canino), no entanto, os autores não conseguiram associar padrões genéticos com a origem geográfica dos isolados estudados. Em nosso estudo, também não conseguimos associar padrões genéticos de *L. braziliensis* exclusivos com a origem geográfica de procedência dos pacientes.

Evidências de que o sistema imune do hospedeiro possa desempenhar um importante papel na seleção de populações de parasitos também tem sido relatado (Macedo et al., 1998; Brito et al., 2003).

Alguns autores admitem que o hospedeiro atue como um filtro biológico, selecionando sub-populações de parasitos mais adaptados a se desenvolverem em seu organismo (Oliveira et al., 2010; Oliveira et al., 2012). Isso poderia explicar, em parte, a similaridade de 100% constatada entre amostras obtidas de diferentes pacientes. De acordo com Reis et al (2010), ainda não existem evidências de resistência parasitária primária em território brasileiro, como já relatado para outras áreas endêmicas. Pelo fato da resposta ao tratamento ser multifatorial, inúmeras abordagens devem ser consideradas nesse contexto. No Estado do Rio de Janeiro, região endêmica de LTA, casos de falha terapêutica ao antimonial ou reativação clínica, estão sendo monitorados por uma equipe multidisciplinar e futuras investigações utilizando-se um número maior de isolados acrescidos de novos marcadores poderão somar-se aos resultados obtidos neste estudo e contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na resistência ao fármaco de primeira escolha.

Finalizando, este estudo investigou aspectos relacionados à heterogeneidade genética e à sensibilidade ao antimoniato de meglumina em 54 amostras de *L.*

braziliensis isoladas de casos Respondedores e Não Respondedores ao tratamento e pelos resultados obtidos não foi possível associar padrões genéticos dos parasitos às características do grupo de pacientes ou mesmo, aos níveis de DL₅₀ encontrado para amostras de *L. braziliensis* obtidas de pacientes Respondedores e Não Respondedores ao tratamento com antimoniato de meglumina 5mb Sb^v/Kg/dia.

7. Conclusões

- Ⓢ Amostras de *L. braziliensis* isoladas de pacientes Não Respondedores ao tratamento pelo antimoníaco de meglumina apresentaram, em média, menor sensibilidade ao mesmo medicamento nos ensaios *in vitro*, sugerindo possível correlação desse parâmetro com o desfecho terapêutico na LC;
- Ⓢ Os níveis de sensibilidade de *L. braziliensis* ao antimoníaco de meglumina, nos ensaios *in vitro*, não foram influenciados pela origem geográfica dos isolados;
- Ⓢ Os valores médios da IDRM foram significativamente maiores no grupo de pacientes Respondedores e sugerem que o resultado deste teste possa ser um indicativo de resposta terapêutica da LTA;
- Ⓢ A técnica de LSSP-PCR não permitiu relacionar padrões genéticos de *L. braziliensis* com a origem geográfica, com a sensibilidade *in vitro* ao antimoníaco nem com o desfecho terapêutico, sugerindo que a resposta terapêutica da LC possa ser mais influenciada por fatores do hospedeiro do que dos parasitos.

8. Referências

- Aït-Oudhia K, Gazanion E, Vergnes B, Oury B and Sereno D. Leishmania antimony resistance: what we know what we can learn from the field. Parasitol Res. 2011; 109:1225–1232
- Alexander J, Russell DG. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. Adv. Parasitol. 1992; 31:175-254.
- Al Jaser, el-Yazigi A, Kojan M, Croft SL. Skin uptake, distribution, and elimination of antimony following administration of sodium stibogluconate to patients with cutaneous leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother. 1995 Feb; 39(2):516-9.
- Alvarenga JS, Ligeiro CM, Gontijo CM, Cortes S, Campino L, Vago AR, Melo MN. KDNA Genetic Signatures Obtained by LSSP-PCR Analysis of *Leishmania (Leishmania) infantum* Isolated from the New and the Old World. PLoSOne. 7(8):e43363. 2012.
- Antoine JC, Prina E, Jouanne C, Bongrand P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. Infect Immun. 1990; 58: 779-787.
- Antônio LF. Resposta à Intradermorreação de Montenegro, Tempo de Evolução da lesão e ocorrência de falha terapêutica na forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana: um estudo caso-controle. 2012, 92 f. Dissertação de Mestrado – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Rio de Janeiro.
- Azeredo-Coutinho RB, Mendonça SC, Callahan H, Portal AC, Max G. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. J Parasitol. 2007 Jun; 93(3):688-93.
- Armijos RX, Weigel MM, Calvopina M, Mancheno M, Rodriguez R. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. Acta Trop. 2004; 91(2):153-60.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol. 2000; 30(12-13):1269-81.
- Bates PA, Gottlieb M, Dwyer DM. *Leishmania donovani*: identification of glycoproteins

- released by promastigotes during growth *in vitro*. *Exp Parasitol*. 1988 Dec; 67(2):199-209.
- Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, Conceição-Silva F, Rosalino CM, Salgueiro MM, Pacheco RS. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Exp Parasitol*. 2009 Apr; 121(4):317-22. Epub 2008 Dec 16.
- Baptista, C. Variabilidade Genética e Sensibilidade ao Antimonial *in vitro* de Amostras de *Leishmania sp.* Isoladas de Pacientes com LTA. 2011, 103f. Tese de Doutorado – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Rio de Janeiro.
- Basselin M, Badet-Denisot MA, Lawrence F, Robert-Gero M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated, and pentamidine-resistant *Leishmania*. *Exp Parasitol*. 1997 Mar; 85(3):274-82.
- Belli A, Rodriguez B, Aviles H, Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 58:102-109.
- Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis*. 1988; 10:560-586.
- Berman JD, Hanson WL, Lovelace JK, Waits VB, Jackson JE, Chapman WL, Jr., et al. Activity of purine analogs against *Leishmania donovani in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987; 31(1):111-3.
- Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985; 27:916-920.
- Bhattacharya G, Herman J, Delfin D, Salem MM, Barszcz T, Mollet M, et al. Synthesis and antitubulin activity of N1- and N4-substituted 3,5-dinitro sulfanilamides against African trypanosomes and *Leishmania*. *J Med Chem*. 2004; 47(7):1823-32.
- Blum JA, Hatz HCF. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Travelers 2009. *J Travel Med*. 2009; 16(2): 123-131.
- Brasil, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasília 2000, 62 p.

- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.180 p.
- Bray PG, Barrett MP, Ward SA, de Koning HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol.* 2003; 19(5):232-9.
- Brito RO, Affonso PR, Silva JC Jr. Chromosomal diversity and phylogenetic inferences concerning thrips (Insecta, Thysanoptera) in a semi-arid region of Brazil. *Genet Mol Res.* 2010 Nov 16; 9(4):2230-8.
- Brito VN, Souto PC, Cruz-Höfling MA, Ricci LC, Verinaud L. Thymus invasion and atrophy induced by *Paracoccidioides brasiliensis* in BALB/c mice. *Med Mycol.* 2003 Apr; 41(2):83-7.
- Brochu C, Wang J, Roy G, Messier N, Wang XY, Saravia NG, et al. Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(10):3073-9.
- Buates S, Matlashewski G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. *J Infect Dis.* 1999; 179(6):1485-94.
- Camara Coelho LI, Paes M, Guerra JA, Barbosa MG, Coelho C, Lima B, Brito ME, and Brandão Filho SP. Characterization of *Leishmania spp.* causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res.* 2011 March; 108(3): 671–677.
- Carrió J, Portús M. *In vitro* susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during *in vitro* or *in vivo* passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. *BMC Pharmacol.* 2002 May 2;2:11.
- Carter NS, Drew ME, Sanchez M, Vasudevan G, Landfear SM, Ullman B. Cloning of a novel inosine-guanosine transporter gene from *Leishmania donovani* by functional rescue of a transport-deficient mutant. *J Biol Chem.* 2000; 275(27):20935-41.
- Chulay JD, Fleckenstein L, Smith DH. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988; 82(1):69-72.

- Coutinho CE, Santos DO, Baptista C, Figueiredo FB, Madeira Mde F. Evaluation of *Leishmania (Leishmania) chagasi* strains isolated from dogs originating from two visceral leishmaniasis-endemic areas in Brazil using multilocus enzyme electrophoresis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011 Oct; 44(5):572-5. Epub 2011 Aug 19.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(1):111-26.
- Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo LB, Oliveira-Neto MP, Brito MEF, Falqueto A, Naiff MF e Grimaldi Jr G. Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(7):3126–3132.
- Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. Genetic diversity among *Leishmania (Viannia)* parasites. *Ann Trop Med Parasitol.* 1997 Sep; 91(6):617-26.
- Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 50(3):296-311.
- Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G Jr. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998 Sep-Oct; 93(5):663-8.
- De Bruijn MH, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.* 1992 Sep; 52(1):45-58.
- De-La Cruz, V.F.; Neckelmann, N.; Simpson, L. Sequences of six genes and several open reading frames in the kinetoplast maxicircle DNA of *Leishmania tarentolae*. *J Biol Chem.*, 1984; v. 259, n. 24, p. 15136-15147.
- De Oliveira Camera P, Junger J, do Espírito Santo Silva Pires F, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Fernandes O, Pirmez C. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Dec; 100(12):1112-7. Epub 2006.
- Da-Cruz AM, Machado ES, Menezes JA, Rutowitsch MS, Coutinho SG. Cellular and humoral immune responses of a patient with American cutaneous leishmaniasis and AIDS. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992 Sep-Oct; 86(5):511-2.
- Decuyper S, Vanaerschot M, Bruncker K, Imamura H, Müller S, Khanal B, Rijal

- S, Dujardin JC, Coombs GH. Molecular mechanisms of drug resistance in natural *Leishmania* populations vary with genetic background. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(2):e1514. Epub 2012 Feb 28.
- Demicheli C, Frézard F, Lecouvey M, Garnier-Suillerot A. Antimony (V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Apr 15; 1570(3):192-8.
- Demicheli C, Ochoa R, da Silva JB, Falcão CA, Rossi-Bergmann B, de Melo AL, Sinisterra RD, Frézard F. Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004 Jan; 48(1):100-3.
- Dietze R, Carvalho SF, Valli LC, Berman J, Brewer T, Milhous W, et al. Phase 2 trial of WR6026, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 65(6):685-9.
- Dorea JG, Costa JML, Holzbecher J, Ryan DE and Marsden PD. Antimony Accumulation in Hair during Treatment of Leishmaniasis. *Clin Chem*. 1987; 33(11):2081-2062.
- Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, Olivier M, Papadopoulou B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J*. 1997 May 15; 16(10):2590-8.
- Eresh S, Mc Callum SM, Barker DC. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitol* 1994; 109: 423-33.
- Fairlamb AH. Ceramide Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol*. 1992; 46:695-729.
- Faraut-Gambarelli F, Piarroux R, Deniau M, Giusiano B, Marty P, Michel G, Faugère B, Dumon H. *In vitro* and *in vivo* resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Apr; 41(4):827-30.
- Fergusson, M.; Torri, A.F.; Ward, D.C.; Englund, P.T. *In situ* hybridization of the

- Crithidia fasciculata* kinetoplast reveals two antipodal sites involved in kinetoplast DNA replication. *Cell*, 1992; v. 70, p. 621-629.
- Ferreira GA, Soares FC, Vasconcelos SA, Rodrigues EH, Werkhäuser RP, de Brito ME, Abath FG. Discrimination of *Leishmania braziliensis* variants by kDNA signatures produced by LSSP-PCR. *J Parasitol*. 2007 Jun; 93(3):712-4.
- Ferreira C dos S, Martins PS, Demicheli C, Brochu C, Ouellette M, Frézard F. Thiol-induced reduction of antimony (V) into antimony (III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals*. 2003 Sep; 16(3):441-6.
- Figuroa RA, Lozano LE, Romero IC, Cardona MT, Prager M, Pacheco R, Diaz YR, Tellez JA, Saravia NG. Detection of *Leishmania* in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) species*. *J Infect Dis*. 2009 Aug 15; 200(4):638-46.
- Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*. 2009 Jun. 30; 14(7):2317-36.
- Friedrich K. Estudos da cinética do antimônio e alterações de citocromo P450 em primatas e ratos tratados com antimoniato de meglumina. 2008, 165 f. Tese de doutorado Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Fries, D.S., and Fairlamb, A.H. Antiprotozoal agents. In, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 6th ed. (D.J. Abraham, ed.) Wiley, Hoboken, NJ, 2003.
- Georges E, Bradley G, Gariépy J, Ling V. Detection of P-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87:152-156.
- Goad LJ, Holz GG, Jr., Beach DH. Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. *Mol Biochem Parasitol*. 1984; 10(2):161-70.
- Goncalves O, Drobetsky E, Meuth M. Structural alterations of the aptt locus induced by deoxyribonucleoside triphosphate pool imbalances in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol*. 1984; 4(9):1792-9.
- Goodwin LG. Pentostan (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1995; 89:339-341.

- Goodwin LG, Page JE. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem J.* 1943 Jul; 37(2):198-209.
- Grimaldi Jr G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am j Trop Med Hyg.* 1989; 41: 687-725.
- Grogl M, Oduola AM, Cordero LD, Kyle DE. *Leishmania spp.*: development of pentostam-resistant clones *in vitro* by discontinuous drug exposure. *Exp Parasitol.* 1989; 69:78-90.
- Grogl M, Thomason TN, Franke ED. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 47:117-126.
- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson AD. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis.* 2002 Aug; 2(8):494-501.
- Guevara P, Ramírez JL, Rojas E, Scorza JV, González N, Añez N. *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure. *Lancet.* 1993 May 22; 341(8856):1341.
- Guevara P, Rojas E, Gonzalez N, Scorza JV, Añez N, Valera M, Ramírez JL. Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1994 Jul; 1(4):385-9.
- Hadighi R, Mohebbali M, Boucher P, Hajjarian H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med.* 2006 May; 3(5):e162. Epub 2006 Apr 18.
- Handman E, Goding JW. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *Embo J.* 1985; 4:329-336.
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999; 354:1191-1199.
- Ishikawa EA, Silveira FT, Magalhaes AL, Guerra junior RB, Melo MN, Gomes R, Silveira TG, Shaw JJ. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96(Suppl 1):S111-21.

- Janvier F, Morillon M, Olliaro P. Visceral leishmaniasis: clinical sensitivity and resistance to various therapeutic agents. *Med Trop (Mars)*. 2008; 68(1):89-101.
- Khatami A, Firooz A, Gorouhi F, Dowlati Y. Treatment of acute Old World cutaneous leishmaniasis: a systematic review of the randomized controlled trials. *J Am Acad Dermatol*. 2007; 57(2):335-29.
- Kidane, G.Z.; Hugues, D.; Simpson, L. Sequence heterogeneity and anomalous electrophoretic mobility of kinetoplast minicircle DNA from *Leishmania tarentolae*. *Gene*, 1984; v. 27, p. 265-277.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In K Killick-Kendrick, *The leishmaniasis in biology and medicine*, Academic Press, London. 1987; 1-120.
- Lainson R, Ryan L, Shaw JJ. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987 Jul-Sep; 82(3):421-4.
- Loiseau PM, Bories C. Mechanisms of drug action and drug resistance in *Leishmania* as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators. *Curr Top Med Chem*. 2006; 6(5):539-50.
- Lopes UG, Momen H, Grimaldi G Jr, Marzochi MC, Pacheco RS, Morel CM. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol*. 1984 Feb; 70(1):89-98.
- Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, Arevalo J. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49: 348-56.
- Lucumi A, Robledo S, Gama V, Saravia NG. Sensitivity of *Leishmania viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(8):1990-5.
- Luke CJ, Marshall MA, Zahradnik JM, Bybel M, Menefee BE, Barbour AG. Growth-inhibiting antibody responses of humans vaccinated with recombinant outer surface protein A or infected with *Borrelia burgdorferi* or both. *J Infect Dis*. 2000 Mar; 181(3):1062-8.
- Luz ZM, Silva AR, Silva Fde O, Caligiorne RB, Oliveira E, Rabello A. Lesion aspirate

- culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Feb; 104(1):62-6.
- Maarouf M, de Kouchkovsky Y, Brown S, Petit PX, Robert-Gero M. *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp Cell Res*. 1997; 232(2):339-48.
- Maarouf M, Lawrence F, Croft SL, Robert-Gero M. Ribosomes of *Leishmania* are a target for the aminoglycosides. *Parasitol Res*. 1995; 81(5):421-5.
- Macedo MF, Velders MP, Nieland JD, Rudolf MP, Weijzen S, Da Silva DM, Franke A, Holt G, Loviscek K, Carbone M, Kast WM. Cellular immunity and immunotherapy against deoxyribonucleic acid virus-induced tumors. *Monaldi Arch Chest Dis*. 1998 Apr; 53(2):211-8.
- Machado PR, Lessa H, Lessa M, Guimarães LH, Bang H, Ho JL, Carvalho EM. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2007 Mar 15; 44(6):788-93. Epub 2007 Feb 2.
- Mahajan SK, Machhan P, Kanga A, Thakur S, Sharma A, Prasher BS, Pal LS. Kala-Azar at high altitude. *J Commun Dis*. 2004 Jun; 36(2):117-20.
- Maly P, Sundgren P, Baath L, Golman K, Walday P. Adverse reactions in myelography. *Acta Radiol Suppl*. 1995; 399:230-7
- Marcussi VM, Marcussi LM, Barbosa-Tessmann, Lonardon MVC, Silveira TGV. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: new primers for identification using polymerase chain reaction. *Exp Parasitol* 2008; 120: 300-5.
- Maria Edileuza Felinto de Brito, Maria Sandra Andrade, Filipe Dantas-Torres, Eduardo Henrique Gomes Rodrigues, Milena de Paiva Cavalcanti, Alzira Maria Paiva de Almeida and Sival Pinto Brandão-Filho. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012 Jul 26. pii: S0037-86822012005000006. [Epub ahead of print]
- Martins L, Alexandrino A, Guimarães G. Detection of *Leishmania braziliensis* DNA in American tegumentary leishmaniasis patients. *Rev Saude Publica*. 2010 Jun; 44(3):571-4. Epub 2010.
- Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniases in Brazil:

- emerging anthrozoosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica*. 1994; 10 Suppl 2:359-75. Epub 2004 Mar 19.
- Miekeley N, Mortari SR, Schubach AO. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. *Anal Bioanal Chem*.2002; 372 3:495-502.
- Ministério da Saúde (Brasil). Boletim Eletrônico Epidemiológico. Brasília, Brasil; 2010. Disponível:http://porta.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_02_ano10.pdf
- Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Trav. Med. And Infec.Dis*. 2007; 5, 150-158.
- Miranda ES, Miekeley N, De-Carvalho RR, Paumgarten FJ. Developmental toxicity of meglumine antimoniate and transplacental transfer of antimony in the rat. *Reprod Toxicol*. 2006; 21(3):292-300.
- Miranda LFC. Sensibilidade ao antimonial pentavalente in vitro de amostras de *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas antes e após o tratamento de pacientes com falha terapêutica. 2011. Dissertação de Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- Moreira ES, Soares RM, Petrillo-Peixoto M de L. Glucantime susceptibility of *Leishmania* promastigotes under variable growth conditions. *Parasitol Res*. 1995; 81(4):291-5.
- Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980 Nov; 77(11):6810-4.
- Morris, J.C.; Drew, M.E.; Klingbeil, M.M.; Motyka, S. A.; Saxowsky, Z.W.; Englund, P.T. Replication of kinetoplast DNA: na update for the new Millennium. *Int J for Parasitology*, 2001; v. 31, p. 453-458.
- Mortari SR. Determinação da concentração total de antimônio e de suas espécies químicas em amostras clínicas de pacientes com leishmanioses. 2001;142 f. Departamento de Química. Pontifícia Universidade Católica (PUC), Rio de Janeiro.

- Mottram JC, Coombs GH. *Leishmania mexicana*: enzyme activities of amastigotes and promastigotes and their inhibition by antimonials and arsenicals. *Exp Parasitol.* 1985 Apr; 59(2):151-60.
- Mouta-Confort E. Ensaio imunoenzimático com antígeno de *Leishmania (Viannia) braziliensis* no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. 2009. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas] - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fiocruz. Rio de Janeiro.
- Mukhopadhyay R, Dey S, Xu N, Gage D, Lightbody J, Ouellette M, Rosen BP. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996 Sep 17; 93(19):10383-7.
- Mukherjee A, Padmanabhan PK, Singh S, Roy G, Girard I, Chatterjee M, Ouellette M, Madhubala R. Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Feb; 59(2):204-11. Epub 2007 Jan 9.
- Navin TR, Arana BA, Arana FE, Berman JD, Chajon JF. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J Infect Dis.* 1992; 165:528-534.
- Ntambi, J.M.; Englund, P.T. A gap at a unique location in newly replicate kinetoplast DNA minicircle from *Trypanosoma equiperdum*. *Biol. Chem.*, 1985; v. 260, p. 5574-5579.
- Oliveira, FS. Estudo Clínico-Molecular na Leishmaniose Mucocutânea: Diagnóstico e rastreamento de Subpopulações de *Leishmania (Viannia) braziliensis* aos níveis inter e intrapacientes. 2011, 160 f. Tese de Doutorado – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Rio de Janeiro.
- Oliveira FS, Valete-Rosalino CM, Schubach Ade O, Pacheco Rda S. kDNA minicircle signatures of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in oral and nasal mucosa from mucosal leishmaniasis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010 Apr; 66(4):361-5.
- Oliveira FS, Valete-Rosalino CM, de Oliveira Schubach A, de Fátima Madeira M, da Silva Pacheco R. Genetic polymorphism in *Leishmania (Viannia) braziliensis* detected in mucosal leishmaniasis of HIV-infected and non-HIV-infected patients.

- Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012 Nov; 106(11):683-7. Epub 2012 Sep 3.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Araujo ML, Pirmez C. 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(2):207-9.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC, Pirmez C. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). Am J Trop Med Hyg. 1997; 57(6):651-5.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C. Treatment of American cutaneous leishmaniasis: a comparison between low dosage (5 mg/kg/day) and high dosage (20 mg/kg/day) antimony regimens. Pathol Biol (Paris). 1997; 45(6):496-9.
- Oster CN, Chulay JD, Hendricks LD, Pamplin CL, 3rd, Ballou WR, Berman JD, Takafuji ET, Tramont EC, Canfield CJ. American cutaneous leishmaniasis: a comparison of three sodium stibogluconate treatment schedules. American Journal Trop Med Hyg. 1985; 34:856-860.
- Ouakad M, Vanaerschot M, Rijal S, Sundar S, Speybroeck N, Kestens L, Boel L, De Doncker S, Maes I, Decuypere S, Dujardin JC. Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. Parasitology. 2011 Sep; 138(11):1392-9. Epub 2011 Aug 8.
- Pacheco RS, Grimaldi G Jr, Momen H, Morel CM. Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. Parasitology. 1990 Jun; 100 Pt 3:393-8.
- Pacheco RS, Martinez JE, Valdemara AL, Momen H, Saravia NG. Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. Mol Biochem Parasitol 1995; 69: 197-209.
- Pacheco RS, Thomaz N, Momen H. kDNA cross-hybridization between *Endotrypanum* and periplarian *Leishmania*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990; 84:4-531.
- Paris C, Loiseau PM, Bories C, Bréard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Mar; 48(3):852-9.
- Pena SDJ, Barreto G, Vago AR, DE Marco L, Reinach FC, Dias Neto E, Simpson AJG.

- Sequence-specific “gene signatures” can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:1946-1949.
- Perry MR, Wyllie S, Prajapati VK, Feldmann J, Sundar S, Boelaert M, Fairlamb AH. Visceral leishmaniasis and arsenic: an ancient poison contributing to antimonial treatment failure in the Indian subcontinent? *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Sep; 5(9):e1227. Epub 2011 Sep 27.
- Pessôa SB, Barretto MP. *Leishmaniose Tegumentar Americana*. Ministério da Educação e Saúde, Serviço de Documentação, Rio de Janeiro. 1948; 527 p.
- Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jesús MN e Marzal PC. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte. *Quim Nova*. 2003; 26(4):550-555.
- Ray DS. Conserved sequences blocks in kinetoplast minicircles form diverse species of trypanosomes. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 1365-67.
- Rees PH, Keating MI, Kager PA, Hockmeyer WT. Renal clearance of pentavalent antimony (sodium stibogluconate). *Lancet*. 1980; 2:226-229.
- Reis ML, Ferreira VM, Zhang X, Gonçalves R, Vieira LQ, Tafuri WL, Mosser DM, Tafuri WL. Murine immune response induced by *Leishmania major* during the implantation of paraffin tablets. *Virchows Arch*. 2010; 457(5):609-18.
- Roberts WL, Berman JD, Rainey PM. *In vitro* antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Jun; 39(6):1234-9.
- Roberts WL, Rainey PM. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Sep; 37(9):1842-6.
- Rocha-Lima CM, Raez LE. Erlotinib (tarceva) for the treatment of non-small-cell lung cancer and pancreatic cancer. *P T*. 2009 Oct; 34(10):554-64.
- Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol*. 1990; 71(3):267-75.
- Rogers WO, Wirth DF. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Jan; 84(2):565-9.
- Rodrigues AM, Hueb M, Santos TA, Fontes CJ. Factors associated with treatment

- failure of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate. Rev Soc Bras Med Trop. 2006 Mar-Apr; 39(2):139-45. Epub 2006 May 5.
- Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. J Infect Dis. 2006 May 15; 193(10):1375-83. Epub 2006 Apr 7.
- Romero GAS, Guerra MVF, Paes MG, Macedo VO. Comparison of Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: Therapeutic Response to Meglumine Antimoniate. Am J Trop Med Hyg. 2001; 65(5):456-465.
- Russell DG, Wilhelm H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. J Immunol. 1986; 136:2613-2620.
- Ryan, K.A.; Shapiro, T.A.; Rauch, C.A.; Englund, P.T. Replication of kinetoplast DNA in trypanosomes. Annu Rev Microbiol., 1988; v. 42, p. 339-358.
- Ryan KA, Shapiro TA, Rauch CA, Griffith JD, Englund PT. A knotted free minicircle in kinetoplast DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Aug;85(16):5844-8.
- Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC. Leishmaniasis treatment, a challenge that remains: a review. Parasitol Res. 2008 Jun; 103(1):1-10.
- Saravia NG, Weigle K, Segura I, Giannini SH, Pacheco R, Labrada LA, Goncalves A. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection--reactivation or reinfection? Lancet. 1990 Aug 18; 336(8712):398-402.
- Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, de Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Araújo ML, Souza WJ, Haddad F, Perez Mde A, Pacheco RS, Momen H, Coutinho SG, de Almeida Marzochi MC, Marzochi KB, da Costa SC. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001 Oct; 96(7):987-96.
- Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araújo ML, Oliveira AL, Pacheco RS, Momen H, Conceicao-Silva F, Coutinho SG, Marzochi KB. 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(6):824-7.
- Schubach, AO, Marzochi KB, Moreira JS, Schubach TMP, Araújo ML, Vale ACF, Passos SRL e Marzochi MCA. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumineantimoniate. Ver Soc Bras Med Trop. 2005; 38(3):213-217.
- Sereno D, Lemesre JL. *In vitro* life cycle of pentamidine-resistant amastigotes: stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistance induced. Antimicrob Agents Chemother. 1997 Sep; 41(9):1898-903.
- Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaiissi A, Lemesre JL. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an *in vitro* model to investigate the pentavalent antimony mode of action. Antimicrob Agents Chemother. 1998 Dec; 42(12):3097-102.
- Sereno D, Roy G, Lemesre JL, Papadopoulou B, Ouellette M. DNA transformation of *Leishmania infantum* axenic amastigotes and their use in drug screening. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(4):1168-73.
- Shapiro, T.A. Kinetoplast DNA maxicircles: Networks within networks. Proc Natl Acad Sci. USA. 1993; v, 90, p. 7809-7813.
- Shapiro TA & Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. Annu Rev Microbiol 1995; 49:117-43.
- Shlomai, J. The assembly of kinetoplast DNA. Parasitology Today, 1994; v. 10,p. 341-346.
- Silveira FT, Ishikawa EA, De Souza AA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. Parasite. 2002 Mar; 9(1):43-50.
- Silveira FT, Lainson R, Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneousleishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008 Nov; 102(11):1075-80. Epub 2008 Jul 3.
- Simpson L. The mitochondrial genoma of Kinetoplastid protozoa: genomic

- organization, transcription, replication and evolution. *Ann Rev Microbiol.* 1987; 41:363-382.
- Simpson L, Berliner J. Isolation of the kinetoplast DNA of *Leishmania tarentolae* in a form of a network. *J. Protozool.* 1974; v. 21, p. 382-393.
- Singh N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res.* 2006 Mar; 123(3):411-22
- Siviero do Vale, EC e Furtado T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Na Bras Dermatol.* 2005; 80.
- Sneath PH e Sokal RR. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W. H Freeman & Co. 1973; 571.
- Soto J, Hernandez N, Mejia H, Grogl M, Berman J. Successful treatment of New World cutaneous leishmaniasis with a combination of topical paromomycin/methylbenzethonium chloride and injectable meglumine antimonate. *Clin Infect Dis.* 1995; 20(1):47-51.
- Soto J, Toledo J, Valda L, Balderrama M, Rea I, Parra R, Ardiles J, Soto P, Gómez A, Molleda F, Fuentelsaz C, Anders G, Sindermann H, Engel J, Berman J. Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. *Clin Infect Dis.* 2007; 44(3):350-6.
- Strelkova MV, Pacheco RS, Bulat SA, Rakitskaya TA. Comparison of some molecular-genetic techniques for identification of *Leishmania* circulating in natural foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis in the central Asia region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997 Jan-Feb; 92(1):109-14.
- Sudhandiran G, Shaha C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Biol Chem.* 2003; 278(27):25120-32.
- Sundar S. Liposomal amphotericin B. *Lancet.* 2001 Mar 10; 357(9258):801-2.
- Sundar S, Chatterjee M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res.* 2006 Mar; 123(3):345-52.
- Sundar S, Gupta LB, Makharia MK, Singh MK, Voss A, Rosenkaimer F, et al. Oral

- treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. *Ann Trop Med Parasitol*.1999; 93(6):589-97.
- Sundar S, Mehta H, Suresh AV, Singh SP, Rai M, Murray HW. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. *Clin Infect Dis*. 2004 Feb 1; 38(3):377-83. Epub 2004 Jan 13.
- Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, Kumar PC, Murray HW. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis*. 2000 Oct; 31(4):1104-7.
- Teixeira AC, Paes MG, Guerra JO, Prata A e Silva-Vergara ML. Failure of both azithromycin and antimony to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2008; 50(3):157-160.
- Thakur CP, Kumar M, Pandey AK. Comparison of regimes of treatment of antimony-resistant kala-azar patients: a randomized study. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 45(4):435-41.
- Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Apr; 87(7):2414-8.
- Tojal da Silva AC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GA. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health*. 2006 Sep; 11(9):1388-98.
- Tovar J, Wilkinson S, Mottram JC, Fairlamb AH. Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the tryA gene locus. *Mol Microbiol*. 1998 Jul; 29(2):653-60.
- Veiga JP, Wolff ER, Sampaio RN, Marsden PD. Renal tubular dysfunction in patients with mucocutaneous leishmaniasis treated with pentavalent antimonials. *Lancet*. 1983; 2(8349):569.
- Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(8):3010-5.
- Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Doncker SD, Ramirez L, Croft S, Arevalo J, Adai V, Bermudez H, Decuypere S, Dujardin JC. American tegumentary

- leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *J Infect Dis.* 2006; 194(8):1168-75.
- Yeates C. Sitamaquine (Glaxo SmithKline/Walter Reed Army Institute). *Curr Opin Investig Drugs.* 2002; 3(10):1446-52.
- Weigle KA, Valderrama L, Santrich C, Saravia NG. Recurrences of tegumentary leishmaniasis. *Lancet.* 1985 Sep 7; 2(8454):557-8.
- Wirth DF, McMahon-Pratt D. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proc Natl Acad USA* 1982; 79:6999-7003.
- Wirth DF, Rogers WO, Barker R, Dourado H, Suesbang L, Albuquerque B. Leishmaniasis and malaria: DNA probes for diagnosis and epidemiologic analysis. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;569:183-92.
- World Health Organization. Essential leishmaniasis maps.
http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html 2010
- Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Pereira LI, Pelli de Oliveira MA, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SR. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health.* 2010 Jan;15(1):68-76. Epub 2009 Oct 26.

9. Anexos

9.1. Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido¹

**INSTITUIÇÃO: INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS –
FIOCRUZ**

COORDENADOR DA PESQUISA: ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH

ENDEREÇO: Av. Brasil 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP 21045-900

**TELEFONES (0xx21) 598-4260 / 598-4263 / 598-4266 / 290-1943 FAX (0xx21) 590-
9988**

**NOME DO PROJETO DE PESQUISA: ESTUDO PARA A SISTEMATIZAÇÃO DO
ATENDIMENTO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA NO CENTRO DE REFERÊNCIA EM LTA - INSTITUTO DE
PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS - FIOCRUZ**

NOME DO VOLUNTÁRIO: _____

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença que atinge seres humanos e animais, incluindo o cão, causada por parasitos chamados Leishmanias. A doença é transmitida pelo "mosquito palha", que vive em regiões de mata, plantações de banana, manga etc. localizadas próximas às moradias humanas, onde costuma entrar para se alimentar de sangue de pessoas e animais domésticos. A LTA se apresenta como feridas na pele de difícil cicatrização. Algumas vezes, a LTA pode se tornar mais grave, envolvendo as mucosas de revestimento interno do nariz e da garganta, mesmo vários anos após a cicatrização da ferida na pele. Atualmente, não temos como saber qual paciente adoecerá de novo e qual permanecerá curado definitivamente.

Outras doenças como infecções por bactérias, tuberculose, sífilis,

¹

1^a via: Prontuário Médico

2^a via: Paciente

esporotricose, outras micoses, tumores etc. podem se manifestar de forma parecida com a leishmaniose e precisam ser diferenciadas para que se possa iniciar o tratamento correto. Entretanto, com os exames existentes atualmente, nem sempre se consegue ter certeza absoluta sobre qual a doença em questão.

No momento, várias perguntas precisam ser respondidas como: de que outras maneiras a LTA pode se manifestar? como se comportam os exames de laboratório antes, durante e após o tratamento? quais pacientes, mesmo após o tratamento, irão reabrir suas cicatrizes ou irão desenvolver doença dentro do nariz ou na garganta? que outras doenças parecidas estão sendo confundidas com a LTA e quais exames devem ser utilizados para esclarecimento? qual o papel dos seres humanos como reservatórios da doença? quais as melhores formas de tratamento? que medidas devem ser tomadas para controlar o problema?

Pelo presente documento, você está sendo convidado(a) a participar de uma investigação clínica a ser realizada no IPEC-Fiocruz, com os seguintes objetivos:

1. Descrever aspectos da LTA: manifestações clínicas e exames de laboratório, tentando estabelecer padrões de apresentação da doença e seu modo de evolução, comparando com outras doenças.
2. Avaliar o uso dos antimoniais e outras drogas utilizadas no tratamento da LTA levando em consideração o tempo de tratamento, toxicidade, facilidade de administração, custo e ausência de envolvimento das mucosas do nariz e da garganta.
3. Isolar, identificar e comparar as espécies de *Leishmaniacausadoras* da LTA provenientes de diversas localidades.

Este documento procura esclarecê-lo sobre o problema de saúde em estudo e sobre a pesquisa que será realizada, prestando informações, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você poderá recusar-se a participar de uma ou todas as etapas da pesquisa ou, mesmo, se retirar dela a qualquer momento, sem que este fato lhe venha causar qualquer constrangimento ou penalidade por parte da Instituição. O seu atendimento médico não será prejudicado caso você decida não participar ou caso decida sair do estudo já iniciado. Os seus médicos poderão também interromper a sua participação a qualquer momento, se julgarem conveniente para a sua saúde.

A sua participação com relação ao Projeto consiste em autorizar a realização

de uma série de exames para o diagnóstico da sua doença, e que parte deste material, assim como os resultados destes exames de rotina, sejam utilizados neste estudo. Também será necessária a sua autorização: 1) para a utilização de documentação fotográfica ou filmagem de suas lesões para estudo 2) para que parte do material coletado periodicamente para a realização de exames para acompanhamento da evolução da sua doença, assim como os resultados destes exames de rotina e do seu tratamento sejam utilizados neste estudo 3) para que parte das amostras coletadas seja estocada a fim de servir para outros estudos que tenham como finalidade a melhor compreensão da doença, o desenvolvimento e avaliação de novos métodos diagnósticos; avaliação da resposta ao tratamento etc., desde que tal estudo seja previamente analisado e autorizado por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Os exames e procedimentos aplicados lhe serão gratuitos. Você receberá todos os cuidados médicos adequados para a sua doença.

Participando deste estudo você terá algumas responsabilidades: seguir rigorosamente as instruções do seu médico; comparecer à unidade de saúde nas datas marcadas; relatar a seu médico todas as reações que você apresentar durante o tratamento, tanto positivas quanto negativas.

Caso você necessite de atendimento médico, durante o período em que estiver participando do estudo, procure o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz, mesmo fora do seu agendamento. Em caso de necessidade ligue para o Dr. Armando de Oliveira Schubach, Dra. Fátima Conceição-Silva ou Dra. Mariza Salgueiro nos telefones acima. Caso você apresente qualquer quadro clínico que necessite de internação, a equipe médica providenciará seu leito no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz. Seus animais com suspeita de LTA poderão ser atendidos gratuitamente pela médica veterinária Dra. Tânia Maria Pacheco Schubach no Serviço de Zoonoses do IPEC.

Sua identidade será mantida como informação confidencial. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade e suas imagens poderão ser divulgadas desde que você não possa ser reconhecido. Entretanto, se necessário, os seus registros médicos estarão disponíveis para consulta para a equipe envolvida no estudo, para o Comitê de Ética em Pesquisa, para as Autoridades Sanitárias e para você.

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo, assim como a qualquer momento durante o

tratamento. O seu médico deverá oferecer todas as informações necessárias relacionadas à sua saúde, aos seus direitos, e a eventuais riscos e benefícios relacionados à sua participação neste estudo.

Procedimentos, exames e testes que serão utilizados:

Antes do tratamento haverá coleta de informações sobre a doença; exame médico geral e exame da pele com descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões; exame interno do nariz e da garganta com um aparelho chamado fibra ótica, que permite ver lesões pequenas ou em locais de difícil acesso, para descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões (se necessário será aplicado "spray" anestésico local). Retirada, com anestesia local, de um pequeno fragmento da lesão de pele, de mucosa ou de "íngua" para realização de exames tanto para diagnóstico (aspecto microscópico do tecido doente e culturas para tentativa de isolamento de possíveis agentes de doença como fungos, bactérias e leishmanias) quanto para pesquisa (identificação de células e outros componentes da resposta inflamatória, assim como novos métodos de identificação dos possíveis agentes da doença). Outros materiais também poderão ser coletados na tentativa de isolamento do agente causador da doença: aspiração com seringa e agulha do bordo da lesão e de secreções em lesões de pele fechadas.

Outros exames também serão realizados para diagnosticar outras doenças possíveis de serem confundidas com a LTA, para classificar a gravidade da doença e avaliar os efeitos dos medicamentos a serem utilizados durante o seu tratamento: um a quatro testes cutâneos (injeção da décima parte de um mililitro de um reativo para determinada doença na pele da região anterior do antebraço, a qual deverá ser revista entre 2 a 3 dias após a injeção); exames de sangue (quantidade equivalente a aproximadamente três colheres de sopa), exame de saliva (coletada com um tipo de cotonete), radiografia dos pulmões e da face (se necessário complementada por tomografia computadorizada); e eletrocardiograma.

O tratamento da LTA em pacientes humanos costuma ser com o medicamento glucantime por via intramuscular (IM), intravenosa (IV) uma injeção ao dia, geralmente, durante um período de 30 dias contínuos ou com intervalos de descanso. Excepcionalmente, para idosos, pacientes com doenças graves ou que não tolerem o tratamento normal, poderá ser utilizada a via intralesional (IL). O tempo do tratamento poderá ser diminuído ou aumentado conforme a necessidade. Outras

opções de tratamento são a anfotericina B (IV) e a pentamidina (IM), ambas injetáveis e necessitando medidas de acompanhamento parecidas com as do glucantime.

Após o início do tratamento, você deverá comparecer a aproximadamente três consultas dentro de 10, 20 e 30 dias. Caso as lesões não cicatrizem totalmente, o tratamento poderá ser continuado pelo período de tempo necessário. Ao se atingir a cura clínica, você deverá retornar para consulta de reavaliação em 1, 3, 6, 9 e 12 meses após o término do tratamento. E, a partir de então, pelo menos uma vez por ano durante um prazo indefinido (no mínimo 5 anos).

A cada retorno deverão ser realizados avaliação médica e exames de sangue (na quantidade aproximada de uma ou duas colheres de sopa) para avaliar os efeitos dos medicamentos utilizados no seu tratamento e/ou para avaliar a evolução da doença. Outros exames, como o eletrocardiograma durante o tratamento, poderão ser realizados quando indicados.

Inconvenientes e riscos principais conhecidos até os dias atuais:

A coleta de sangue poderá causar alguma dor no momento da punção venosa e, eventualmente, poderá haver a formação de uma área arroxeadada no local, que voltará ao normal dentro de alguns dias.

Ocasionalmente, os testes na pele poderão, apresentar uma reação forte com inflamação do local, formação de bolhas e, mais raramente, formação de ferida. Todo o processo costuma regredir dentro de alguns dias a poucas semanas.

Tanto os testes na pele quanto o anestésico injetado no momento da biópsia (retirada de um pequeno fragmento de pele para exame) poderão causar alergia, geralmente limitada ao aparecimento de áreas vermelhas, empoladas e com coceira na pele e que respondem bem a medicamentos antialérgicos. Mais raramente poderá haver uma reação mais severa com dificuldade de respirar e necessidade de cuidados mais intensos, existentes no IPEC.

No local da biópsia poderá ocorrer inflamação e dor, acompanhados ou não de infecção por bactérias. Caso isso ocorra, poderá ser necessário o uso de medicamentos para dor e antibióticos.

Os medicamentos glucantime e pentamidina costumam causar efeitos indesejáveis, não devem ser utilizados na gravidez e seu uso em mulheres em idade reprodutiva deve ser acompanhado de uso de método anticoncepcional eficaz como

preservativo de látex masculino ou feminino ("camisinha"), diafragma feminino ou anticoncepcional oral ("pílula"). Quando o tratamento não puder ser adiado, a anfotericina B poderá ser utilizada na gravidez. Os exames com raios-x também não devem ser realizados em grávidas.

Formas de ressarcimento:

Sempre que necessário, nos dias de seu atendimento, poderá ser fornecida alimentação conforme rotina do Serviço de Nutrição e Serviço social do IPEC para pacientes externos.

Benefícios esperados:

Espera-se que, ao final do tratamento, você esteja curado da LTA, embora as consultas de retorno por vários anos após o tratamento sejam necessárias para a confirmação da cura. Os resultados deste estudo poderão ou não beneficiá-lo diretamente, mas no futuro, poderão beneficiar outras pessoas, pois espera-se também que este estudo contribua para que o diagnóstico e acompanhamento do tratamento de pacientes com LTA possa ser feito de forma mais eficaz e segura.

Caso a sua investigação demonstre outro diagnóstico diferente de LTA, você será devidamente orientado a buscar o tratamento mais adequado para o seu caso.

Declaro que li e entendi todas as informações referentes a este estudo e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe médica, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento e pelo presente consinto, voluntariamente, em participar deste estudo de pesquisa.

Nome paciente:

—
Data

Nome médico:

—
Data

Nome testemunha¹:

—
Data

Nome testemunha²:

—
Data

Apenas no caso de pacientes impossibilitados de manifestar o seu consentimento por escrito.

No caso de menores de 18 anos, deverá ser assinado pelo pai, mãe ou responsável legal.

2

Apenas no caso de pacientes impossibilitados de manifestar o seu consentimento por escrito.
No caso de menores de 18 anos, deverá ser assinado pelo pai, mãe ou responsável legal.

9.2. Anexo 2 - Termo de Confidencialidade

TERMO DE CONFIDENCIALIDADE

Os responsáveis pelo projeto de pesquisa “Investigação *in vitro* da sensibilidade ao antimonial pentavalente em amostras de *Leishmaniabraziliensis* isoladas de casos respondedores e não respondedores ao tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana” se comprometem a manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto.

A identidade dos participantes, assim como os resultados obtidos com este projeto, será mantida em um banco de dados sob nossa responsabilidade.

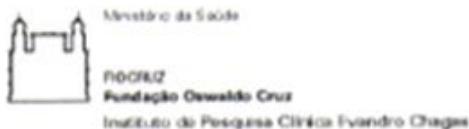
Os resultados obtidos com esta pesquisa serão divulgados em comunicações científicas mantendo o anonimato dos participantes e o material utilizado não será empregado em outras pesquisas, a não ser quando abertos novos protocolos.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 20__

Armando de O. Schubach

Thalita Gagini Braga

9.3. Anexo 3– Parecer ético consubstanciado CEP



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 010/2012

CAAE 0065.0.009.000-11

1. Identificação:

Título do Projeto: "Investigação da sensibilidade *in vitro* ao antimonial pentavalente em amostras de *Leishmania braziliensis* isoladas de pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana com antimonialto de meglumina".

Pesquisador Responsável: Armando de Oliveira Schubach.

Doutoranda: Thalita Gagini Braga.

Instituição Proponente: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FIOCRUZ.

Data de Apresentação ao CEP: 21/12/2011.

2. Sumário:

Visa a investigar a sensibilidade *in vitro* ao antimonialto de meglumina de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas de pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento da LTA. Tem como objetivos específicos: 1) Determinar a DL₅₀ das amostras selecionadas expostas ao antimonialto de meglumina *in vitro*; 2) Investigar o polimorfismo genético das amostras selecionadas empregando a técnica LSSP-PCR; 3) Comparar os resultados obtidos nos ensaios de sensibilidade *in vitro* e polimorfismo genético com a resposta terapêutica ao antimonialto de meglumina e com os dados clínico-epidemiológicos dos pacientes. Trata-se de um estudo retrospectivo, através de consulta ao banco de informações e amostras biológicas do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (Vigileish) visando comparar aspectos relacionados à heterogeneidade genética e a sensibilidade ao antimonialto pentavalente (Sb^v) em amostras de *Leishmania braziliensis* isoladas de pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento da LTA, considerando a origem geográfica dos pacientes. As amostras de *Leishmania* que serão avaliadas encontram-se criopreservadas e constituem um acervo do banco de amostras biológicas do Vigileish e foram obtidas de pacientes diagnosticados e tratados com esquemas de baixas doses (5mg) de Sb^v, por via intramuscular e de forma contínua, considerando o período de 1998 a 2011. Para o estudo serão utilizadas somente amostras isoladas antes da introdução do tratamento. O tamanho amostral será de conveniência constituindo 4 grupos, obedecendo a critérios de inclusão e exclusão, visando uniformizar alguns parâmetros dos grupos estudados: a) Grupo composto por 20 amostras isoladas de pacientes respondedores ao tratamento pelo antimonial apresentando epitelização completa das lesões ao término do tratamento ou durante o período de observação, cuja infecção tenha sido adquirida no Rio de Janeiro; b) Grupo composto por 20 amostras isoladas de pacientes não respondedores ao tratamento pelo antimonial, cuja infecção tenha sido adquirida no Rio de Janeiro. Esse grupo poderá ser composto por pacientes que apresentaram falha terapêutica ou reativação ao longo do período considerado para o estudo. A medicação utilizada para o retratamento não será considerada; c) Grupo composto por 10 amostras isoladas de pacientes respondedores ao tratamento pelo antimonial apresentando epitelização completa das lesões ao término do tratamento, cuja

"Investigação da sensibilidade *in vitro* ao antimonial pentavalente em amostras de *Leishmania braziliensis* isoladas de pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana com antimonialo de meglumina".

infecção tenha sido adquirida em outros estados brasileiros; d) Grupo composto por 10 amostras isoladas de pacientes não respondedores ao tratamento pelo antimonial, cuja infecção tenha sido adquirida em outros estados brasileiros. Esse grupo poderá ser composto por pacientes que apresentaram falha terapêutica ou reativação ao longo do período considerado para o estudo. A medicação utilizada para o retratamento não será considerada.

3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Projeto com delineamento adequado. Através da assinatura de um Termo de Compromisso, os pesquisadores envolvidos se comprometerão a manter em sigilo a identidade dos pacientes, assim como a confidencialidade e a privacidade dos dados nesse estudo. Este estudo constitui um desdobramento do projeto "Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas", CAAE 0016.0.009-03 e do projeto "*Leishmania (Viennia) braziliensis*: avaliação da sensibilidade ao antimonial pentavalente *in vitro* com amostras isoladas de pacientes que apresentaram falha terapêutica", CAAE 0050.0.009.000-10, aprovados pelo CEP-IPEC em 04/11/2002 e 25/10/2010, respectivamente. Todos os pacientes cujas amostras serão estudadas já possuem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os recursos para o material de consumo já foram obtidos junto ao PA do VigiLeish e projetos aprovados.

4. Diligências:

Não houve.

Parecer: APROVADO.

Data da Reunião: 27 de fevereiro de 2012.

Assinatura do Coordenador:



Dr. Leila Kamille Bouf
Coordenadora do CIEC/EP
Instituto de Pesquisa Clínica
UNIC/FECC/UNIC