



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
Instituto Pesquisa Clínica Evandro Chagas  
Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

---

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

CIBELE BAPTISTA

VARIABILIDADE GENÉTICA E SENSIBILIDADE AO ANTIMONIAL  
*IN VITRO* DE AMOSTRAS DE *Leishmania* sp. ISOLADAS DE  
PACIENTES COM LTA

RIO DE JANEIRO

2011

VARIABILIDADE GENÉTICA E SENSIBILIDADE AO ANTIMONIAL  
*IN VITRO* DE AMOSTRAS DE *Leishmania* sp. ISOLADAS DE  
PACIENTES COM LTA

CIBELE BAPTISTA

Tese apresentada ao curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientada por Armando Oliveira Schubach e Raquel da Silva Pacheco.

Rio de Janeiro

2011

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

B222

Baptista, Cibele

Variabilidade genética e sensibilidade ao antimonial *in vitro* de amostras de *leishmania sp.* isoladas de pacientes com LTA / Cibele Baptista. – Rio de Janeiro, 2011.

xii, 95 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2011.

Bibliografia: f. 77-83

1. Leishmaniose. 2. Reativação. 3. Falha terapêutica. I. Título.

CDD 616.9364

CIBELE BAPTISTA

VARIABILIDADE GENÉTICA E SENSIBILIDADE AO ANTIMONIAL *IN VITRO*  
DE AMOSTRAS DE *Leishmania* sp. ISOLADAS DE PACIENTES COM LTA

Tese apresentada ao curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadores: Dr. Armando Oliveira Schubach

Dra. Raquel Silva Pacheco

Aprovada em 24 / 02 / 2011.

Banca examinadora

---

Dra. Fátima Conceição Silva (Presidente) IOC/Fiocruz

---

Dr. Leonor Laura Leon (componente) IOC/Fiocruz

---

Dr. David Eduardo Barroso (componente) IOC/Fiocruz

---

Dra. Keyla Feldman B. Marzochi (componente) IPEC/Fiocruz

---

Dra. Maria de Fátima Madeira (componente) IPEC/Fiocruz

---

Dra. Eliame Mouta Confort (suplente) IPEC/Fiocruz

*Dedico este trabalho aos meus pais  
Adairton e Valeria pelo sentimento  
de amor incondicional e meus avós  
Délio e Bruna, verdadeiros  
guerreiros neste mundo de tantas  
provas...*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A **Deus** por estar presente em minha vida;

Aos **meus pais** por serem meu maior exemplo de como manter a ética frente as dificuldades que a vida apresenta e por me darem o presente de fazer parte desta linda família;

A minha querida tia **Maria Teresa Trevisan** (*in memoriam*) por seu exemplo de humildade e dignidade durante todos os momentos de sua vida;

A todos os **meus familiares** que apesar da saudade e distância destes anos me deram forças e o suporte necessário para que eu chegasse até aqui;

Ao **Alvaro P. Ribeiro** pelo amor, paciência e apoio na minha vida profissional;

À **Dra. Maria de Fátima Madeira** por nortear todos os meus passos desde o meu mestrado até este momento, por estimular meu crescimento científico e profissional, por orientar e colaborar ativamente na realização deste trabalho, e principalmente pelo carinho e ética que demonstra a toda sua equipe: “Muito Obrigada!”;

Ao **Dr. Armando O. Schubash** por me acolher em sua equipe e me orientar durante a execução de todos os trabalhos, pelo carinho, respeito e cuidado no tratamento com todos e principalmente por seu exemplo de profissionalismo ético diante de todas as circunstâncias: “Muito Obrigada!”;

**Dra Raquel S. Pacheco** pela orientação, ensinamentos científicos e apoio na execução deste trabalho;

À mestrandia **Luciana F. Miranda** pela colaboração neste estudo, principalmente na realização das leituras das lâminas e pela demonstração de carinho desde o dia que a conheci;

À **Dra. Fátima-Conceição** por me acompanhar durante os seminários, pelas ótimas sugestões e cuidado na revisão desta tese;

À **Dra. Leonor L. Leon** pelo carinho, suporte e orientação nos experimentos de sensibilidade *in vitro*;

As **Ms. Juliana H. S. Barros** e **Andressa G. S. Pinto** pela colaboração durante a realização dos experimentos;

Aos anjinhos (**Fábio, Cris, Andressa, Dani e Ana Claudia**) que Deus colocou em minha vida e hoje “moram” especialmente em meu coração;

Especialmente ao carinho das amigas **Luanda, Juliana, Tati, Cintia C., Ale, Cintia M. e Luciana**;

À **Dra. Maria Ines Pimentel** pelo carinho e colaboração com as informações do banco de dados e imagens dos pacientes utilizados neste estudo,

À **Dra Eliame M. Confort** pelo incentivo e orientação nas tentativas de padronização da reação de imunofluorescência com glicoproteína P;

À **Dra Keyla Marzochi** por gentilmente aceitar meu convite às pressas e participar da banca examinadora desta tese;

À **equipe do LabVigiLeish**, e do **Lab. de Enteroparasitoses e Malária – IPEC** pela amizade e exemplo real do que é “trabalho em equipe”;

À **equipe dos Laboratórios de Sistemática e Bioquímica, e Bioquímica de Tripanosomatídeos do IOC-Fiocruz**, pelo suporte neste trabalho;

Ao Instituto Kinder do Brasil (**IKB**), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio de Janeiro (**FAPERJ**), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo apoio financeiro e bolsa disponibilizada para a realização deste estudo;

Aos **pacientes** que voluntariamente permitiram a realização deste trabalho;

Finalmente meu profundo agradecimento e respeito aos **animais** que foram utilizados neste estudo.

Muito obrigada!

*“Aquilo que nos salva é dar o primeiro passo. Depois outro. É sempre o mesmo passo, mas é preciso fazê-lo.”*

*(Antoine de Saint-Exupéry)*

Baptista, C. **Variabilidade genética e sensibilidade ao antimonial *in vitro* de amostras de *Leishmania* sp. isoladas de pacientes com LTA.** Rio de Janeiro, 2011 XX f. Tese  
[Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica  
Evandro Chagas-IPEC/Fiocruz

## RESUMO

O fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses é o antimônio pentavalente e apesar de seus efeitos tóxicos, ainda se mostra a mais efetiva entre as drogas disponíveis. A leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta-se como uma doença infecciosa com diferentes formas clínicas. A resposta ao tratamento com antimoniais pentavalentes é variável e pode resultar em cura clínica, falha terapêutica ou reativação da doença após resposta favorável inicial. O objetivo deste estudo foi verificar a variabilidade genotípica e a sensibilidade ao antimonial pentavalente *in vitro* de amostras de *Leishmania* sp. obtidas de pacientes com LTA. Na primeira etapa um “screening” inicial foi realizado em amostras de pacientes com evoluções clínicas típicas e atípicas da LTA no estado do Rio de Janeiro. Foram detectados nove genótipos sem associação com a evolução clínica da LTA. Um novo estudo comparando pares de isolados antes do tratamento (A) e após o insucesso terapêutico ou reativação das lesões cutâneas (B) de um mesmo paciente, através da técnica de LSSP-PCR, detectou polimorfismo genético na maioria das amostras pareadas (A e B). Sete destes pares foram expostos a diferentes concentrações de antimônio pentavalente *in vitro*. Sob as condições do nosso estudo, formas promastigota e amastigota (A e B) foram sensíveis ao glucantime *in vitro*, no entanto os valores de IC<sub>50</sub> obtidos com formas promastigotas foram muito variáveis. Nas formas amastigotas, as amostras B apresentaram valores de IC<sub>50</sub> mais elevados que as amostras A, em quatro dos sete pacientes avaliados. Estes resultados sugerem que as amostras isoladas destes quatro pacientes após falha terapêutica ou reativação são mais resistentes *in vitro* ao antimônio pentavalente. No entanto, todos os pacientes curaram após retratamento final. Dentro da complexa relação parasito-hospedeiro, os resultados apresentados neste estudo sugerem que fatores tanto do parasito como do hospedeiro exerçam papel semelhante na evolução favorável ou não da LTA.

**Palavras-chave:** 1. Leishmaniose 2. Reativação 3. Falha Terapêutica

Baptista, C. **Genetic variability and sensitivity to antimony *in vitro* of *Leishmania* sp. isolated from patients with ATL.** Rio de Janeiro, 2011 XX f. Thesis [PhD in Clinical Research in Infectious Diseases] Institute of Clinical Research Evandro Chagas – IPEC/Fiocruz

### Abstract

The drug of first choice for the treatment of leishmaniasis is the pentavalent antimony and despite its toxic effects, it still shows to be the most effective among the available drugs. American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is an infectious disease with different clinical forms. The response to treatment with pentavalent antimonials is variable and can result in clinical cure, therapeutic failure or reactivation of the disease after initial favorable response. The aim of this study was to verify the genotypic variability and sensitivity to pentavalent antimony *in vitro* in samples of *Leishmania* sp. obtained from patients with ATL. In a first step, an initial screening was performed on samples of patients with typical and atypical clinical development of ATL in the state of Rio de Janeiro. Nine genotypes were detected without association with clinical development of ATL. A new study comparing pairs of isolates before treatment (A) and after therapeutic failure or reactivation of cutaneous lesions (B) of the same patient by LSSP-PCR technique detected genetic polymorphism in most paired samples (A and B). Seven of these pairs were exposed to different concentrations of pentavalent antimony *in vitro*. In the conditions of our study, promastigote and amastigote forms (A and B) were sensitive to meglumine antimoniate *in vitro*, however the IC<sub>50</sub> values obtained with promastigotes were highly variable. In amastigotes forms, the B samples demonstrated IC<sub>50</sub> values greater than the A samples in four of seven patients. These results suggest that the strains isolated from these four patients after treatment failure or reactivation *in vitro* can be more resistant to pentavalent antimony. All patients were cured after final retreatment, five of them with second choice drugs. Regarding the complex host-parasite relationship, the results verified here suggest that factors of the parasite and also of the host play similar role in the response, favorable or not, in the ATL.

**Keywords:** 1. Leishmaniasis 2. Reactivation 3. Therapeutic failure

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- bp** – Pares de bases  
**CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa  
**DNA** – Ácido desoxirribonucleico  
**dNTPs** – di-deoxinucleotídeos Trifosfato  
**EDTA** – (Ethylenediamine tetraacetic acid) Ácido etilenodiamino tetra-acético  
**g** – Grama  
**IC<sub>50</sub>** – Concentração de Inibição de 50%  
**IM** – Intramuscular  
**IV** – Intravenosa  
**IL** – Intralesional  
**kDNA** – DNA do cinetoplasto  
**LC** – Leishmaniose Cutânea  
**LCD** - Leishmaniose Cutânea Disseminada  
**LCM** – Leishmaniose Cutaneomucosa  
**LM** – Leishmaniose Mucosa  
**LSSP-PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase de Baixa Estringência Utilizando Um Único Primer  
**LTA** – Leishmaniose Tegumentar Americana  
**LT** – Leishmaniose Tegumentar  
**LV** – Leishmaniose Visceral  
**mg** – Miligrama  
**mL** – Mililitro  
**MLEE** – Eletroforese de Multilocus Enzimáticos  
**ng** – Nanograma  
**NNN** – Meio de cultura de Novy, Nicolle e McNeal  
**PCR** – Reação em Cadeira da Polimerase  
**µg** – Micrograma  
**µL** – Microlitro  
**RAPD** – Análise do Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. LEISHMANIOSE – A DOENÇA.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. LEISHMANIOSE – O TRATAMENTO.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4. MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIMONIAIS.....</b>	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
<b>2. 1. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>12</b>
<b>2. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>12</b>
<b>3. ARTIGOS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>13</b>
3.1. <i>LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS</i> GENOTYPES IDENTIFIED IN LESIONS OF PATIENTS WITH ATYPICAL OR TYPICAL MANIFESTATIONS OF TEGUMENTARY LEISHMANIASIS: EVALUATION BY TWO MOLECULAR MARKERS	14
3.2. GENETIC POLYMORPHISM OF <i>LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS</i> ISOLATES BEFORE AND AFTER THERAPEUTIC FAILURE OR REACTIVATION OF CUTANEOUS LESIONS .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
3.3. AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS CAUSED BY <i>LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS</i> RESISTANT TO MEGLUMINE ANTIMONIATE AND WITH GOOD RESPONSE TO PENTAMIDINE: A CASE REPORT	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
3.4. <i>LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS</i> : AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> AO ANTIMONIAL PENTAVALENTE, COMPARANDO ISOLADOS PAREADOS OBTIDOS ANTES E APÓS O INSUCESSO TERAPÊUTICO NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>ANEXOS 1. TERMO DE CONSENTIMENTO....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. LEISHMANIOSE – A DOENÇA**

As leishmanioses são doenças infectoparasitárias que apresentam diversas manifestações clínicas, determinando significativa mortalidade e morbidade em países em desenvolvimento. São causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas ao homem e animais (domésticos e silvestres) através da picada de insetos vetores conhecidos como flebotomíneos (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; WHO, 2008).

A distribuição geográfica das leishmanioses abrange quatro continentes (Asiático, Africano, Europeu e Americano) e cerca de 88 países situados em regiões de clima tropical e subtropical com prevalência de 12 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões de pessoas expostas ao risco de adquirir a doença. Anualmente, são registrados aproximadamente 1-2 milhões de novos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; WHO, 2008; WHO, 2011).

No Continente Americano as leishmanioses podem ser agrupadas em leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA). A LTA é endêmica na América Latina onde o processo de urbanização tem sido associado à sua expansão (AMATO et al, 2007, TUON et al, 2008).

A LTA é causada por protozoários dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (LAINSON & SHAW, 1987); Gênero *Leishmania*; Ordem Kinetoplastida; Família

Trypanosomatidae (ROSS, 1903) que se perpetuam com sucesso através de dois hospedeiros: os insetos flebotomíneos (Ordem Díptera; Subfamília Phlebotominae; Gênero *Lutzomyia*) e os hospedeiros vertebrados. Os hospedeiros vertebrados se infectam a partir da inoculação das formas promastigotas metacíclicas do parasito através da picada da fêmea do inseto vetor (flebotomíneo) no momento do repasto sanguíneo. Os parasitos apresentam em seu ciclo de transmissão duas formas ou estágios, a forma amastigota, imóvel, sem flagelo livre, que parasita as células do sistema fagocítico-mononuclear dos hospedeiros vertebrados e a forma promastigota, flagelada, de vida extracelular, móvel, encontrada no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado (GRIMALDI JR & TESH, 1993; BATES & ROGERS, 2004; KAMHAWI et al, 2006). As promastigotas inoculadas pelo inseto vetor são rapidamente fagocitadas e transformadas em formas amastigotas no interior de macrófagos do hospedeiro, se multiplicam rompendo a célula infectada, para, a seguir, invadir novas células e dar continuidade à infecção. A doença clínica é uma decorrência dessa multiplicação celular no interior dos macrófagos que gera resposta imunológica no hospedeiro e consequente dano celular (HOARE & WALLACE, 1966; BERMAN & WYLER, 1980; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

No Brasil, a doença tem ampla distribuição geográfica e é causada por sete espécies de *Leishmania*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (L.) amazonensis* e mais recentemente *L. (V.) lindenbergi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Os padrões epidemiológicos são diversos e as características próprias dependem da área endêmica em questão, das espécies do parasito, vetores e reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão, além dos fatores ambientais que afetam essa cadeia. Este padrão que anteriormente estava mais restrito

ao ciclo silvestre, passou a ocorrer na área urbana, periurbana e rural devido principalmente a alterações no meio ambiente tais como desmatamentos e ocupação humana desordenada de áreas florestais (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; PASSOS et al, 1999; CUPOLILLO et al, 2003; SHAW, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Além disto, a introdução de novas espécies, a globalização econômica, o aumento das migrações e as dificuldades no controle da epidemia, estenderam o risco de transmissão para pessoas residentes fora de áreas endêmicas (AMATO et al, 2007). No Brasil, o processo de urbanização descontrolada é incriminado como principal fator de risco para aquisição da doença (DESJEUX et al, 2001).

As principais formas clínicas da LTA são: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa ou cutâneo-mucosa (LM ou LCM), leishmaniose cutânea disseminada (LCDi) e leishmaniose cutânea difusa (LCD). A disseminação de lesões para a mucosa ocorre em uma pequena parcela dos pacientes com LC e a maioria destes indivíduos apresenta cicatriz indicativa de LC anterior (MARSDEN, 1985<sup>a</sup>). Outros apresentam concomitantemente lesões cutâneas e mucosas (MARZOCHI, 1992). Em alguns indivíduos com LM não se encontra cicatriz de lesão antiga. Supõe-se nestes casos que a lesão inicial tenha sido fugaz (MARSDEN, 1986). Em outros a lesão da mucosa ocorre por extensão de lesão cutânea adjacente (contígua) e há também aqueles em que a lesão ocorre inicialmente na semimucosa exposta, como no lábio (MARZOCHI, 1992).

O estado do Rio de Janeiro é uma área endêmica de LTA onde *Leishmania (Viannia) braziliensis* (VIANNA,1911) é a principal espécie incriminada no ciclo de transmissão. Em 2007 foi descrito um primeiro caso autóctone de infecção por *L. (L.) amazonensis* nesta área (AZEREDO-COUTINHO et al, 2007<sup>a</sup>). A apresentação clínica

mais freqüente nesta região endêmica é a úlcera cutânea única ou dupla, arredondada, com evolução recente, localizada em áreas expostas às picadas dos flebotomíneos e com resposta favorável a terapêutica antimonial. As lesões cutâneas múltiplas ou localizadas em áreas normalmente cobertas por vestimentas, assim como lesões com longo tempo de evolução, lesões mucosas, resposta desfavorável ao tratamento antimonial e co-infecção com micobactérias são observadas eventualmente (SCHUBACH et al, 2005; MATOS et al, 2005).

De acordo com o MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010, o critério de cura é clínico e na LC é definido pela cicatrização completa da lesão, com regressão total da infiltração e do eritema até três meses após a conclusão do esquema terapêutico. Na LM a regressão de todos os sinais deve ser verificada por exame otorrinolaringológico até seis meses após o término do tratamento.

O tratamento irregular ou com doses inferiores a 10mg/kg de antimonio pentavalente, presença de três ou mais lesões, longo tempo de evolução da doença, presença de co-morbidades, como infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e ainda a presença de hipertensão arterial tem sido associadas com o insucesso do tratamento da LM ou LC causada por *L. (V.) braziliensis* (RODRIGUES et al, 2006; AMATO et al, 2009).

## **1.2. LEISHMANIOSE – O TRATAMENTO**

Em 1912, Gaspar Vianna demonstrou o uso do tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio trivalente) na cicatrização de lesões cutâneas de alguns pacientes. Entretanto, efeitos secundários graves foram descritos e, na tentativa de minimizar tais efeitos, outros compostos foram testados na década de 1940, desenvolvendo-se então o

primeiro antimonial pentavalente complexado a carboidratos que passou a ser utilizado desde então como fármaco de primeira escolha no tratamento das leishmanioses.

O antimônio pentavalente é utilizado sob a forma de estibogluconato de sódio (Pentostan) ou antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>). O Glucantime é empregado no Brasil e em outros países da América Latina (MISHRA et al, 2007). Apresenta-se comercialmente em ampolas de 5mL, contendo 81 mg de Sb<sup>V</sup> para cada mL, perfazendo um total de 405mg de Sb<sup>V</sup> por ampola. De acordo com o Ministério da Saúde (2010), o tratamento regular para a forma cutânea é aquele que utiliza de 10 a 20mg/Sb<sup>V</sup>/Kg/dia entre 20 a 30 dias, ou 20mg/Sb<sup>V</sup>/Kg/dia entre 30 a 40 dias para a forma mucosa. Em ambos os casos, os intervalos entre as doses não podem ser superiores às 72h. É considerado tratamento irregular aquele que tenha ultrapassado o tempo previsto para um tratamento regular ou quando tenha ocorrido um intervalo superior a 72 horas entre as doses.

As injeções devem ser administradas via intramuscular (IM) ou endovenosa (EV), com repouso após a aplicação. A via EV é considerada mais adequada, pois permite a aplicação de grandes volumes sem o inconveniente da dor local. A aplicação deve ser lenta (duração mínima de 5 minutos), com agulha fina e sem necessidade de diluição. Não são descritas diferenças entre as vias EV e IM, no que diz respeito à eficácia e segurança da droga. No entanto, este medicamento não deve ser administrado em gestantes, pois a droga atravessa a barreira transplacentária e pode impregnar o tecido nervoso do feto, levando a síndromes severas de retardamento mental. Há também restrições do uso dos antimoniais em pacientes co-infectados com HIV, com idade acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A administração do antimonial pentavalente pode levar ao surgimento de efeitos adversos, na seguinte ordem de frequência: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastria, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda. Um dos mais importantes efeitos adversos do Sb<sup>V</sup> é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular que quando detectado indica a suspensão do medicamento e emprego de uma droga de segunda escolha (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). No entanto, quadros de alterações renais e surgimento de pancreatite aguda e morte súbita também são relatados.

As principais diferenças entre os esquemas terapêuticos preconizados em diferentes regiões endêmicas estão relacionadas ao uso de antimoniato de meglumina ou estibogluconato de sódio, administração contínua ou intermitente do fármaco, dose diária, duração do tratamento, critérios utilizados para interromper ou para prolongar o tratamento. Além disso, as espécies e cepas de *Leishmania* envolvidas podem modificar a resposta ao tratamento (SCHUBACH et al, 2005; AREVALO et al, 2007; OLIVEIRA-NETO et al, 2006; MISHA et al, 2007).

De um modo geral, a resposta terapêutica aos antimoniais é tida como favorável na maioria dos casos de leishmanioses, com taxas de cura variáveis dependendo da área endêmica em questão. Entretanto a ocorrência de falha no tratamento na leishmaniose visceral, assim como, nas formas mucosa e cutânea de LTA parece estar aumentando em intensidade e prevalência, tornando-se problema comum em algumas áreas endêmicas (BERMAN, 1988; GROGL et al, 1992; ROJAS et al, 2006, RODRIGUES et al, 2006, UNGER et al, 2009; GORSKY et al, 2010).

A maioria das drogas utilizadas no tratamento da leishmaniose, tanto o antimônio pentavalente como as drogas de segunda escolha tem uma ou mais limitações quanto ao seu emprego, tais como o custo elevado, dificuldade de administração, toxicidade ou ainda o desenvolvimento de resistência contra os compostos antimoniais o que representa um grande obstáculo para o sucesso da terapia (MISHRA et al, 2007). As razões específicas para a não resposta ao tratamento ainda não foram esclarecidas. Possíveis propostas para a questão da falha clínica ou parasitológica e da variabilidade de respostas terapêuticas apresentadas ao tratamento com antimônio pentavalente podem estar ligadas à resistência inerente do parasito ao antimônio, assim como, falhas do hospedeiro quanto à resposta imune, fisiologia e farmacocinética da droga (BERMAN et al, 1982; MARSDEN, 1985<sup>b</sup>; BERMAN, 1988)

No estado do Rio de Janeiro, tratamento utilizando baixas doses de antimonio pentavalente (5mg/kg/dia) ou ainda esquemas alternativos, como a administração em série ou intra-lesional (IL) tem sido utilizados com sucesso, principalmente entre pacientes com co-morbidades ou idosos nos quais a dose plena seria potencialmente mais tóxica (OLIVEIRA-NETO et al, 1997; OLIVEIRA-NETO et al, 2006; SCHUBACH et al, 2005; VASCONCELLOS et al, 2010). Uma taxa de 16% de reativação tem sido descrita para esta região (OLIVEIRA-NETO et al, 1997). No Brasil, um estudo de meta-análise relacionando resposta ao tratamento antimonial em pacientes com LTA, infectados por *L. braziliensis*, foi encontrada uma taxa de cura média em torno de 71,3% (TOUON et al, 2008).

Apesar da dificuldade de administração, da toxicidade potencial e do pouco conhecimento sobre o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes, após anos de utilização, ainda não há no mercado um composto farmacológico que seja igualmente

efetivo, ou superior ao antimonial pentavalente (MARSDEN, 1985<sup>b</sup>). Além disto, poucas são as drogas de segunda escolha disponíveis no tratamento das leishmanioses (CHAKRAVARTY et al, 2010).

Neste contexto, nos casos de impedimento do tratamento com antimoniais ou de falha ao medicamento de primeira escolha, a pentamidina e anfotericina B são os fármacos de segunda escolha utilizados no tratamento (MARSDEN, 1979; BERMAN & LEE, 1983). Algumas drogas alternativas têm sido objeto de estudos acadêmicos ou de instituições de pesquisas, mas até o momento a indústria farmacêutica não demonstra interesse no desenvolvimento de novos fármacos (NUSSBAUM et al, 2010).

#### **1.4. MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIMONIAIS**

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ( $\text{Sb}^{\text{V}}$ ) ainda não está totalmente elucidado. Sabe-se que o antimônio pentavalente atua como uma prodroga que requer a conversão através da redução *in vivo* para a forma trivalente ( $\text{Sb}^{\text{III}}$ ) no sítio de ação (BAIOCCO et al, 2009; CASTILLO et al, 2010).

A atividade leishmanicida ocorre através da inibição da síntese de nucleosídeos da purina e de macromoléculas, da glicólise e do ciclo do ácido cítrico (BERMAN et al. 1985; OUELLETTE & PAPADOPOULOU, 1993). A ação dos antimoniais orgânicos contra protozoários pode envolver a ligação do antimônio a grupos sulfidrila do parasito (ROBERTS et al, 1995), podendo ser este o mecanismo de ação e/ou toxicidade. Outros mecanismos também têm sido discutidos, como por exemplo, a tripanotona redutase considerada essencial para a sobrevivência e virulência do parasito, atuando ainda como mediador na resistência aos antimoniais. Desenho de novas drogas, mais acessíveis e menos tóxicas, têm sido propostas por pesquisadores com base neste sistema.

(BAIOCCO et al, 2009; CASTRO-PINTO et al, 2007; WYLLIE et al. 2004; CUNNINGHAM & FAIRLAMB, 1995). Bombas de extrusão do antimônio intracelular também são descritas como mediadoras de resistência nestes protozoários (MOOKERJEE et al, 2008).

Agentes antimoniais pentavalentes menos tóxicos podem servir como uma pró-droga que no novo sítio de ação é convertida em antimônio trivalente mais tóxico e mais potente que o antimônio pentavalente. O antimônio nestes derivados encontra-se sob a forma de pentóxido ligado a um meio orgânico, formando complexos com açúcares como o ácido glucônico no estibogluconato de sódio (MARSDEN, 1985<sup>b</sup>; BERMAN, 1988). Sugere-se que o macrófago desempenharia papel no mecanismo de ação dos antimoniais, onde ocorreria a concentração do antimonial pentavalente e a sua conversão para trivalente (BERMAN & WYLER, 1980; ROBERTS et al, 1995) que seria o responsável de fato pela atividade leishmanicida (BERMAN et al, 1985; ROBERTS et al, 1995; WYLLIE et al, 2004).

Estudos da atividade de agentes leishmanicidas têm sido realizados tanto *in vivo* em animais infectados experimentalmente, quanto *in vitro*, utilizando formas promastigotas e amastigotas axênicas ou formas amastigotas intracelulares (FUMAROLA et al 2004). A forma promastigota é relativamente menos sensível ao antimônio pentavalente, e a comparação da sensibilidade de formas amastigotas intracelulares de macrófagos com a forma promastigota em meio axênico demonstram que a dose de inibição de ambos compostos (tri e pentavalente) é até 600 vezes maior para promastigotas do que para amastigotas (BERMAN et al. 1985, ROBERTS et al. 1995).

A existência de leishmânias com uma sensibilidade variada aos antimoniais vem sendo descrita e amostras de leishmânias menos sensíveis a ação do antimônio pentavalente podem sugerir uma resistência moderada ao antimônio na natureza (GROGL et al, 1992). Sob pressão de drogas *in vitro*, verificou-se o desenvolvimento de clones de promastigotas resistentes a concentrações crescentes do antimonial (estibogluconato de sódio). Segundo os autores, esta resistência adquirida foi estável e após sucessivas passagens em cultura e manteve-se depois de passagens em animais. Portanto, esta característica permaneceu durante a diferenciação para a forma amastigota sugerindo a hipótese de que a resistência *in vitro* pode se estabelecer *in vivo* (GRÖGL et al, 1989).

As suscetibilidades *in vitro* ao antimônio pentavalente a partir da determinação da concentração de inibição de 50% (IC<sub>50</sub>) das formas viáveis do parasito reportam valores que podem variar segundo o método e as espécies de parasitos analisados. Nos estudos com amastigotas intracelulares de *L. (V.) braziliensis*, os valores da IC<sub>50</sub> variaram de 9-128µg/Sb<sup>v</sup>/mL (ROJAS et al, 2006; AZEREDO-COUTINHO et al, 2007<sup>b</sup>; ZAULI-NASCIMENTO et al, 2010).

Apesar da variabilidade de resultados apresentados na literatura, modelos *in vitro* tem se mostrado bons para avaliação da sensibilidade a fármacos. Segundo Vermeersch et al (2009), quando mecanismos celulares estão envolvidos no mecanismo de ação do fármaco, como é o caso do antimônio pentavalente, o modelo que utiliza amastigotas intracelulares deveria ser empregado como padrão ouro nos estudos. No entanto, mesmo esse modelo apresenta dificuldades no controle e padronização dos experimentos, assim como na laboriosidade que o método exige (FUMAROLA et al, 2004; SERENO et al, 2007).

Embora vários estudos científicos relacionados ao mecanismo de ação e aos fatores que podem influenciar ou determinar a resistência parasitária ao fármaco de primeira escolha no tratamento das leishmanioses sejam descritos, ainda existe necessidade de maior informação e/ou estudos através de novas abordagens, que permitam uma conclusão mais consistente sobre este assunto, que até o presente momento continua pouco compreendido.

## **2. OBJETIVOS**

### **2. 1. OBJETIVO GERAL**

Verificar a variabilidade genotípica e a sensibilidade ao antimonial pentavalente *in vitro* de amostras de *Leishmania* sp. obtidas de pacientes com LTA.

### **2. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- i. Caracterizar fenotipicamente os isolados de *Leishmania* sp.;
- ii. Investigar a variabilidade genética de isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, provenientes de evoluções clínicas típicas e atípicas da LTA;
- iii. Detectar polimorfismos genéticos na população de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em amostras pareadas, isoladas antes e após o insucesso terapêutico ou reativação;
- iv. Comparar a sensibilidade *in vitro* ao antimônio pentavalente de pares de isolados de *L (V.) braziliensis*, antes e após falha terapêutica ou reativação da LTA;
- v. Comparar a sensibilidade *in vitro* ao antimônio pentavalente destes mesmos pares de isolados em ambas as formas evolutivas do parasito (promastigotas e amastigotas);
- vi. Correlacionar os resultados obtidos com os dados clínicos e de resposta terapêutica ao antimonial.

### **3. ARTIGOS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO**

A metodologia empregada nesta tese e os resultados obtidos serão apresentados no formato de artigos científicos publicados e em fase de publicação.

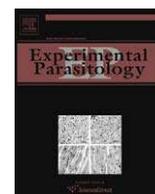
### **3.1. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: Evaluation by two molecular markers**

Artigo publicado no periódico *Experimental Parasitology*

Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, Conceição-Silva F, Rosalino CMV, 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; 121: 317-22.

Neste artigo nosso objetivo foi avaliar o perfil genético entre dois grupos de amostras de *Leishmania* sp. bem definidos: isolados provenientes de pacientes com evoluções clínicas típicas e atípicas de LTA, utilizando diferentes marcadores (MLEE, RAPD e LSSP-PCR). Um total de 34 amostras foram analisadas. Todos os isolados foram identificados como *L. (V.) braziliensis* e nove perfis genéticos diferenciados foram detectados. Nenhuma associação com a forma clínica foi relacionada aos genótipos identificados. Um dado interessante obtido neste estudo foi a variabilidade genética de amostras isoladas antes do início do tratamento e após a reativação da lesão em um mesmo paciente. Esse resultado levantou algumas hipóteses, principalmente relacionadas à seleção de subpopulações que podem ser atribuídas aos diferentes esquemas terapêuticos empregados na rotina do Laboratório de Vigilância em Leishmaniose (IPEC/FIOCRUZ) e nos motivou a analisar um grupo maior de amostras que compõem os demais artigos desta tese.

Este artigo responde os objetivos i. e ii. desta tese.



## *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: Evaluation by two molecular markers

C. Baptista<sup>a,b,\*</sup>, A.O. Schubach<sup>a</sup>, M.F. Madeira<sup>a</sup>, C.A. Leal<sup>a</sup>, M.Q. Pires<sup>c</sup>, F.S. Oliveira<sup>c</sup>, F. Conceição-Silva<sup>d</sup>, C.M.V. Rosalino<sup>a</sup>, M.M. Salgueiro<sup>a</sup>, R.S. Pacheco<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Centro de Referência em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, IPEC/Fiocruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro CEP 21040-900, Brazil

<sup>b</sup>Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, IPEC/Fiocruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro CEP 21040-900, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Sistemática Bioquímica, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro CEP 21040-900, Brazil

<sup>d</sup>Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro CEP 21040-900, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 October 2008

Received in revised form 3 December 2008

Accepted 5 December 2008

Available online 16 December 2008

#### Index Descriptors and Abbreviations:

Leishmaniasis, *Leishmania (Viannia) braziliensis*

MLEE, multilocus enzyme electrophoresis

RAPD, random amplified polymorphic DNA

LSSP-PCR, low stringency single specific primer-polymerase chain reaction

kDNA, kinetoplast DNA, genetic variability

### ABSTRACT

Analyses of MLEE, RAPD and LSSP-PCR were used to compare the panel of american tegumentary leishmaniasis (ATL) isolates obtained from lesions of patients with rare clinical manifestations of the disease and typical lesions. All of the 34 samples analyzed by MLEE demonstrated similar electromorphic profiles with *Leishmania (Viannia) braziliensis* reference strain. Through the RAPD analysis, nine genetic profiles (genotypes) were identified. LSSP-PCR corroborates the initial screening and phenetic analysis has grouped the isolates into two major clusters comprising the nine different genotypes. Prevalent genotype defined as LbmtDNAGen1 was detected in the largest number of isolates. There was no association between genotypes and clinical symptoms. However, two different genotypes could be identified in the initial (LbmtDNAGen9) and reactivated lesion (LbmtDNAGen3) of the same patient. Our results support the idea of a less pronounced genotypic diversity among *L. (V.) braziliensis* circulating in the State of Rio de Janeiro and demonstrate the useful application of these molecular markers in genetics variability studies.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is caused by *Leishmania* species of the subgenera *Leishmania (Viannia)* and *Leishmania (Leishmania)*, which are transmitted to man and other domestic and wild mammals by the bite of sandflies, and is distributed from the south of the United States to the north of Argentina. In Brazil, ATL is found in all states and has shown a high incidence over the last 20 years. The main clinical forms of ATL are cutaneous leishmaniasis, mucosal or mucocutaneous leishmaniasis, and diffuse cutaneous leishmaniasis (Marzochi, 1992).

In the State of Rio de Janeiro, *L. (V.) braziliensis* is the most prevalent species that has so far been implicated in the cycle of ATL. However, more recently an autochthonous case of diffuse leishmaniasis due to *L. (L.) amazonensis* has been reported (Azeredo-Coutinho et al., 2007). Transmission mainly occurs in periurban areas where the primitive rain forest vegetation is being replaced

with disorderly human occupation. In this context, adaptation of the vector *Lutzomyia intermedia* to the domiciliary and peridomiciliary environment has been observed, as well as the presence of infected humans, dogs and horses (Aguilar et al., 1987; Barbosa-Santos et al., 1994; Marzochi, 1992; Marzochi and Marzochi, 1994). The most frequent clinical manifestation is a recent single or double cutaneous ulcer located in areas exposed to the bites of sandflies, which shows a favorable response to antimonial therapy. Multiple or localized skin lesions in areas normally covered by clothing or lesions of long duration, mucosal lesions, an unfavorable response to antimonial treatment, and co-infection with *Mycobacterium* are eventually observed (Matos et al., 2005; de Schubach et al., 2005).

It is known that the clinical manifestations of the disease (Alexander and Russell, 1992; Berman, 1997; Marzochi and Marzochi, 1994) and the response to treatment are related in part to the *Leishmania* species involved (Grogl et al., 1992; Navin et al., 1992). However, little is known about the importance of biological variability within the same *Leishmania* species. Studies conducted in Rio de Janeiro suggest that only one zymodeme (Z 27) of *L. (V.) braziliensis* is involved in the disease in humans and animals (Cupolillo et al., 2003). Several methods can be applied to molecu-

\* Corresponding author. Address: Centro de Referência em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, IPEC/Fiocruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro CEP 21040-900, Brazil. Fax: +55 21 38659541.

E-mail address: [cibele.baptista@ipecc.fiocruz.br](mailto:cibele.baptista@ipecc.fiocruz.br) (C. Baptista).

lar epidemiology and to the study of genetic variability. Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) is widely used for the taxonomic characterization of *Leishmania* species (Cupolillo et al., 1994; Momen et al., 1985; Pacheco et al., 1999) but is limited because the marker is less polymorphic. Some techniques among others, are more frequently applied to the study of genetic diversity in trypanosomatids, including the restriction fragment length polymorphisms of kDNA (RFLP) analysis (Tojal Silva et al., 2006), random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis (Hanafi et al., 2001; Ishikawa et al., 2002; Martinez et al., 2003; Pacheco et al., 2005) and low stringency single specific primer–polymerase chain reaction (LSSP-PCR) analysis (Ferreira et al., 2007).

The objective of the present study was to determine the genetic variability among human ATL isolates in the State of Rio de Janeiro using MLEE as taxonomic tool and, RAPD and LSSP-PCR as polymorphic molecular markers to compare the panel of isolates obtained from lesions of patients with rare clinical manifestations of the disease with that of isolates obtained from patients with manifestations typically found in the State.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples and patients

A total of 34 *Leishmania* isolates obtained from tegumentary lesions of 32 patients living in the State of Rio de Janeiro and diagnosed at Centro de Referência em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (CRLeish/IPEC/FIOCRUZ) were studied.

Group I consisted of 25 *Leishmania* isolates obtained from 23 patients with the following clinical and epidemiological characteristics of ATL rarely reported in this region: co-infection with *Mycobacterium* sp., multiple/disseminated lesions, mucosal involvement, atypical location of the lesions, long-term duration, presence of lymphangitis/adenomegaly, and a poor initial response to antimonial therapy or lesion reactivation after initially successful antimonial treatment.

Group II consisted of isolates from nine patients examined during the same period but with the following clinical and epidemiological characteristics of ATL typically reported in the State of Rio de Janeiro: patients of either sex and of different ages with one or two cutaneous ulcers located in uncovered skin areas, lesion duration of less than 6 months, no prevalence of cases with the mucosal form, and a good response to therapy.

The study was approved by the Research Ethics Committee of IPEC/Fiocruz (process 0016.0.009-02). All patients signed an informed consent form before clinical evaluation and collection of material from the lesions for *Leishmania* culture.

### 2.2. *Leishmania* isolates

*Leishmania* isolates were obtained by inoculation of biopsy fragments from skin or mucosal lesions into biphasic NNN (Novy, Nicolle and McNeal) medium enriched with Schneider's medium and 10% fetal bovine serum. The flasks with the inocula were incubated at a temperature of 26 to 28 °C and monitored weekly for growth until day 30. Positive cultures were maintained at the same temperature, replaced weekly, cryopreserved, and expanded to obtain a parasite pellet used for the techniques described below.

### 2.3. Multilocus enzyme electrophoresis

A system of eight enzymatic loci was used for MLEE: 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH, EC.1.1.1.43), phosphoglucose isomerase (GPI, EC.5.3.1.9), nucleoside hydrolase (NH, 2 loci,

EC. 3.2.2.1), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC.1.1.1.49), malate dehydrogenase (MD, EC.1.1.1.37), malic enzyme (ME, EC.1.1.1.40), isocitrate dehydrogenase (IDHNADP, EC.1.1.1.42), and phosphoglucomutase (PGM, E.C.1.4.1.9). The enzymes, electrophoretic conditions and substrates for development were those described previously (Cupolillo et al., 1994; Pacheco et al., 1999). The gels were analyzed by determining the electrophoretic mobility of the bands based on the standard positions of the following reference strains: *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*—MHOM/BR/75/M2903, *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*—MHOM/BR/74/PP75, and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*—MHOM/BR/1975/M4147.

### 2.4. Random amplified polymorphic DNA analysis

Parasite genomic DNA was extracted using a commercial kit (DNA genomic Prep, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK), followed by additional phenol–chloroform purifications (Pacheco et al., 2005). DNA concentrations and purity were further determined by agarose gel electrophoresis in comparison to known concentrations of standard DNA.

Three decameric primers of arbitrary sequences from Operon Technologies (Cologne, Germany; OPA-07, OPA-14, and OPA-19) were used. The RAPD reactions were carried out according to manufacturer recommendations using 20 ng DNA from each isolate in a final volume of 25 µl. Amplification was performed in a thermocycler using 1 cycle at 95 °C for 5 min, followed by 45 cycles at 95 °C for 1 min, 36 °C for 30 s, 72 °C for 2 min, and final extension at 72 °C for 10 min. The amplification products were analyzed on 2% agarose gel in 1× TBE buffer stained with ethidium bromide, visualized under UV and photographed (UVP Bioimaging System).

### 2.5. PCR assay

DNA was extracted following a previously described protocol (Oliveira et al., 2005). The DNA were amplified using a pair of primers (B1: 5'-GGGGTTGGTGAATATAGTGG-3' and B2: 5'-CTAATTGTG CACGGGGAGG-3'), directed against the variable regions of kDNA (mitochondrial DNA) minicircles from *Leishmania* of the *L. braziliensis* complex (*Viannia* subgenus) (de Bruijn and Barker, 1992).

### 2.6. LSSP-PCR reaction

*L. (V) braziliensis* kDNA 750-bp fragments obtained by PCR were purified by Wizard PCR Prep system (Promega) according to the manufacturer's recommendations. The LSSP-PCR reaction was performed through specific amplifications of the 750 bp fragments using the B1 sequence 5'-GGGGTTGGTGAATATAGTGG-3' as the specific primer. LSSP-PCR reaction was carried out in a 25-µl final volume containing 40 pmol of the primer, 200 µM of each dNTP, 10 mM Tris-HCl at pH 8.6, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 4 IU of Taq polymerase; 60 ng of each DNA template corresponding to 2 µl of the purified 750 bp fragment was added in the reaction.

Amplification was performed in a thermocycler using 1 cycle at 95 °C for 5 min, followed by 45 cycles at 95 °C for 1 min, 36 °C for 30 s, 72 °C for 2 min and final extension at 72 °C for 10 min. The amplification products were analyzed on 2% agarose gel or 7% polyacrylamide gel stained with ethidium bromide.

### 2.7. Numerical (phenetic) analysis

LSSP-PCR bands were compared using the simple matching coefficient of similarity to determine the proportion of mismatched bands between pairs of isolates. The similarity matrix was transformed into a dendrogram using the UPGMA algorithm (Sneath and Sokal, 1962). Phenetic analysis was performed with the

NTSYS-pc program (version 2.02, Exeter Software, Setauket, NY, USA).

### 3. Results

All of the 34 human samples analyzed by MLEE demonstrated similar electromorphic profiles which were similar to that of *L. (V.) braziliensis* reference strain (MHOM/BR/75/M2903). No isoenzymatic variants were observed between parasites isolated from groups I and II, or between isolates obtained from initial and reactivated lesions.

For RAPD analysis, all conditions such as reagents and DNA concentrations of the isolates and thermocycling conditions were the same during all experiments. Three primers (OPA-7: 5'-GAAACGGTG-3', OPA-14: 5'-TCTGTGCTGG-3', OPA-19: 5'-CAAACGTCGG-3') were selected because they amplified the 34 isolates (25 of group I and 9 group II) with good reproducibility and provided more clearly visible bands. Table 1 illustrates the genetic profiles expressed as bands shared by each isolate and the genotypes identified.

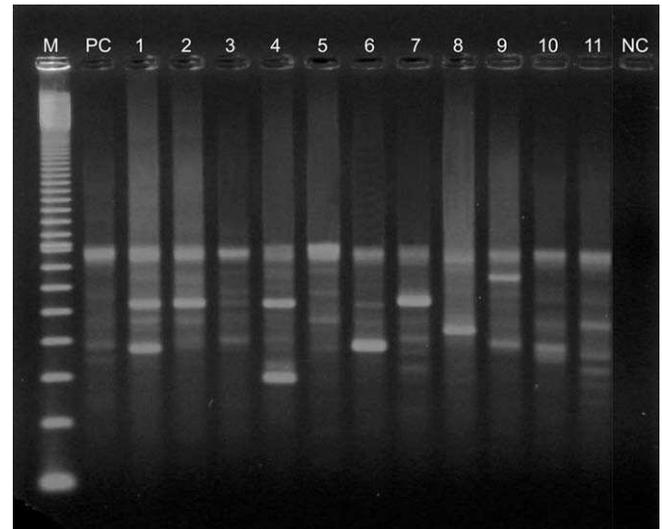
LSSP-PCR analysis corroborates the initial screening confirming the identification of the previous nine genotypes. Phenetic analysis of the LSSP-PCR profiles (Fig. 1) has grouped the isolates into two major clusters comprising the nine different genotypes. Table 2 summarizes the genetic profiles expressed as bands shared by each isolate, the phenetic clusters obtained, and the genotypes identified in each cluster. Two clusters comprising the nine genotypes were identified and the LSSP-PCR dendrogram formed by the data matrix is shown in Fig. 2.

Cluster 1 included the largest number of isolates, with the same genotype (100% similarity) being detected in 64.7% of the samples (22/34) as well as the *L. (V.) braziliensis* reference strain. This pre-

**Table 1**

Shared bands observed in RAPD analyses with 3 different primers and genotypes detected.

Isolate	Shared bands	Group	Genotype
1	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
2	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	II	1
3	1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
5	1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
6	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
30	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
7	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
27	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
26	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	II	1
8	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
24	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
23	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
9	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
10	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	II	1
11	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	II	1
19	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
17	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
16	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
15	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
14	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
13	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	II	1
12	1,3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	1
22	1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	2
25	1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	3
28	1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	8
33	1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	II	3
29	1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13	I	3
35	1, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 13	II	4
4	1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	I	5
34	1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	I	5
21	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,	I	6
20	1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	I	7
31	1, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13	II	8
32	1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13	II	9



**Fig. 1.** Gel electrophoresis showing LSSP-PCR profiles of the nine representative genotypes. M: 100 bp DNA ladder, PC: positive control (*L. (V.) braziliensis* reference strain—MHOM/BR/75/M2903), 1–3: genotype 1, 4: genotype 2, 5: genotype 3, 6: genotype 4, 7: genotype 5, 8: genotype 6, 9: genotype 7, 10: genotype 8, 11: genotype 9, NC: negative control.

valent genotype was defined as LbmtDNAGen1. Other genotypes (LbmtDNAGen2, LbmtDNAGen3, LbmtDNAGen4, LbmtDNAGen5, LbmtDNAGen6) were also grouped in Cluster 1. Cluster 2 included the genotypes LbmtDNAGen7 (samples 25, 28, 33 and 29), LbmtDNAGen8 (sample 31) and LbmtDNAGen9 (sample 21).

Recurrences of initial lesions were observed in seven patients. LbmtDNAGen1 (samples 30, 12, 14, 17, 1, and 9) and LbmtDNAGen3 (sample 22), belonging to cluster 1, were identified in these samples obtained from reactivated lesions after previous treatment.

The LbmtDNAGen1 genotype was detected in two samples from the same patient (samples 6 and 7) with multiple lesions. Genotypes LbmtDNAGen9 and LbmtDNAGen3, belonging to clusters 2 and 1, respectively, were detected in another patient from samples obtained before and after treatment (21 and 22). Parasites present in the reactivated lesion (22) belonging to cluster 1, whereas parasites present in the primary lesion belonged to cluster 2 (21). As could be observed, the genetic profile present in the initial lesion differed from that identified in the reactivated lesion,

### 4. Discussion

The aim of the present investigation was to evaluate the genetic variability between *Leishmania* samples studied by RAPD and LSSP-PCR obtained from lesions of patients with typical or atypical clinical characteristics of ATL seen at the IPEC-Fiocruz outpatient clinic, Rio de Janeiro, Brazil.

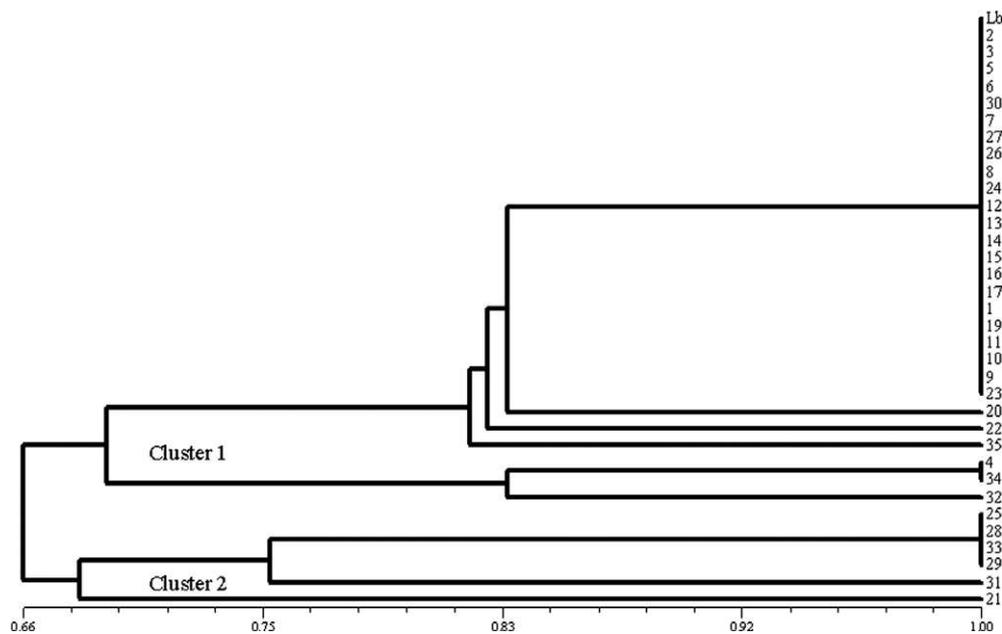
The most frequent manifestation of ATL is a single cutaneous ulcer located in uncovered areas of the body, which presents a circular shape, elevated and well-defined borders and a granular base (Oliveira-Neto et al., 1988). This form was the most predominant in the two groups studied, with the upper and lower limbs being the most affected sites. In infections with *L. (V.) braziliensis*, regional lymphadenopathy generally precedes the occurrence of ulcerations by 1 to 12 weeks (Barral et al., 1992; Gontijo and de Carvalho, 2003). In the present study, lymphangitis was observed in seven cases of group I. Six isolates were detected in the cluster 1 (LbmtDNAGen1 and LbmtDNAGen2) and one isolate was detected in Cluster 2 (LbmtDNAGen7).

The duration of mucosal disease ranged from 8 months to 5 years in 10 of the patients studied. Of these, two required amphi-

**Table 2**  
LSSP-PCR analysis (shared bands), clinical conditions and genotypes identification.

Sample	Group	Clinical condition	Shared bands	Genotype	Cluster
2	II	Cutaneous	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
3	I	Cutaneous	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
5	I	Mucocutaneous <sup>1</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
6	I	Cutaneous <sup>1a, 6</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
30	I	Mucocutaneous <sup>3</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
7	I	Cutaneous <sup>1a, 6</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
27	I	Cutaneous <sup>4</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
26	II	Cutaneous	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
8	I	Cutaneous <sup>6</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
24	I	Mucocutaneous <sup>5</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
23	I	Cutaneous <sup>2</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
12	I	Mucocutaneous <sup>3</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
13	II	Cutaneous	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
14	I	Mucocutaneous <sup>3</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
15	I	Cutaneous <sup>6</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
16	I	Cutaneous <sup>6</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
17	I	Cutaneous <sup>3</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
1	I	Mucocutaneous <sup>3,5</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
19	I	Cutaneous <sup>4</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
11	II	Cutaneous	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
10	II	Cutaneous	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
9	I	Mucocutaneous <sup>3</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	LbmtDNAGen1	1
20	I	Cutaneous <sup>2,6</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12	LbmtDNAGen2	1
22	I	Mucocutaneous <sup>3a,7</sup>	1, 2, 4, 6, 9, 10	LbmtDNAGen3	1
35	II	Cutaneous	1, 2, 3, 5, 6, 7	LbmtDNAGen4	1
4	I	Mucosal <sup>2,7</sup>	1, 2, 5, 6, 8, 9, 11	LbmtDNAGen5	1
34	I	Mucocutaneous <sup>2</sup>	1, 2, 5, 6, 8, 9, 11	LbmtDNAGen5	1
32	II	Cutaneous	1, 2, 4, 6, 7, 8	LbmtDNAGen6	1
25	I	Cutaneous <sup>6</sup>	1, 2, 3, 4, 6, 8	LbmtDNAGen7	2
28	I	Cutaneous	1, 2, 3, 4, 6, 8	LbmtDNAGen7	2
33	II	Cutaneous	1, 2, 3, 4, 6, 8	LbmtDNAGen7	2
29	I	Mucocutaneous	1, 2, 3, 4, 6, 8	LbmtDNAGen7	2
31	II	Cutaneous	1, 2, 4, 5, 6, 8, 10	LbmtDNAGen8	2
21	I	Mucocutaneous <sup>2a,7</sup>	1, 2, 5, 6, 9, 11, 12	LbmtDNAGen9	2

Group I: Samples obtained from lesions of patients with rare clinical manifestations such as <sup>1</sup>Multiple/disseminated lesions, <sup>2</sup>primary lesion of patient with reactivation, <sup>3</sup>reactivated lesion, <sup>4</sup>resistance to treatment (cure with pentavalent antimony), <sup>5</sup>resistance to treatment (cure with amphotericin B), <sup>6</sup>presence of lymphangitis/adenomegaly, <sup>7</sup>presence of co-infections, <sup>a</sup>isolate obtained from the same patient. Group II: Samples obtained from patients with typical clinical manifestations.



**Fig. 2.** UPGMA dendrogram built with the simple matching coefficient of similarity based on the genetic profiles obtained from LSSP-PCR.

tericin B treatment (1, 24), four presented lesion reactivation (patients with isolates 9, 14, 22 and 30), and two were only cured after prolonged treatment. The factors that contribute to the progression of initially cutaneous disease to the late mucosal form are not com-

pletely understood, but it is believed that a delay in the healing of primary skin lesions and inadequate initial treatment are associated (Marsden, 1990; Marsden et al., 1998; Romero et al., 1996). Patients of group I, who presented mucosal involvement, had le-

sions in the nose, mouth and/or palate, larynx and pharynx. Involvement of mucosae other than those of the upper airways is an exception. In the present study, we observed one atypical case in which the glans was affected (sample 24—LbmtDNAGen1).

Recurrence of leishmaniasis after treatment is related to the immune status of the patient (Saravia et al., 1990), the clinical form of the disease and also to virulence factors of the parasite. It is interesting to note that cluster 1 was formed by seven samples (30, 12, 14, 17, 1, 9, and 22) obtained from the reactivated lesions of patients who presented clinical recurrence after a first successful treatment. The genotypes defined for this phenetic cluster were LbmtDNAGen1 (30, 12, 14, 17, 1, and 9) and LbmtDNAGen3 (22). The presence of co-infections (tuberculosis and leprosy) was a factor that impaired the treatment of the patients studied here (4 and 22).

In patients from endemic areas, the distinction between reactivation and re-infection is not always an easy task (Saravia et al., 1990), a fact suggesting the need for genetic screening and the identification of strains circulating in the area (Pacheco et al., 1995). In addition, the persistence of parasites in healed lesions demonstrated by PCR and parasite isolation confirms the viability of this parasite for years after treatment (Schubach et al., 1998a,b; Mendonça et al., 2004). In the present study, two genotypes could be identified in the initial (LbmtDNAGen9) and reactivated lesion (LbmtDNAGen3) of the same patient.

Multiple lesions were observed in two patients, in whom only genotype LbmtDNAGen1 was identified. Gontijo et al. (2002) attributed the high rate of multiple lesions observed in the State of Minas Gerais to vectorial pressure during periods of high transmission, suggesting the possibility of multiple independent infections. According to Schriefer et al. (2004), in the State of Bahia, specific genotypes defined by RAPD analysis were correlated with the mucosal and disseminated clinical form of ATL. In the present study, no association could be established between certain genotypes from samples obtained from skin or mucosal localized or disseminated lesions. However, some particularities were observed. Most samples analyzed belonged to genotype GenLbOPA-1 allocated to cluster 1. Another particularity was the clustering of two genotypes identified in the initial (LbmtDNAGen9) and reactivated lesion (LbmtDNAGen3) of the same patient. The genotypic diversity (GD) estimated based on the number of genotypes detected among all isolates analyzed was 0.26 (9/34), a finding indicating an epidemiological pattern of ATL of low complexity in the State of Rio de Janeiro. The detection of one prevalent genotype (LbmtDNAGen1) in the largest number of isolates obtained from both patients presenting atypical clinical conditions (group I), such as reactivations, resistance to treatment and multiple/disseminated lesions, and patients with the typical clinical signs of ATL (group II) also supports the idea of a less pronounced genotypic diversity among *L. (V.) braziliensis* circulating in the State of Rio de Janeiro.

Our results demonstrate the useful application of RAPD and LSSP-PCR in genetic diversity of leishmanial parasites providing important information about *Leishmania* subpopulations present in distinct clinical manifestations in which the definition of circulating genotypes could be easily assessed.

### Acknowledgments

This work received financial support from Instituto Kinder do Brasil (IKB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Carlos Chagas de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). C.Baptista benefited from funding by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino). A. Schubach is investigator of CNPq, Brazil. We also

thank the Reference Center of Leishmaniasis—IPEC/Fiocruz for providing biopsies of ATL patients. The authors declare that the experiments comply with the current Brazilian Laws.

### References

- Aguilar, C.M., Rangel, E.F., Grimaldi Filho, G., Momen, H., 1987. Human, canine and equine leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area in the State of Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 82, 143.
- Alexander, J., Russell, D.G., 1992. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Advances in Parasitology* 31, 175–254.
- Azeredo-Coutinho, R.B.G., Conceição-Silva, F., Schubach, A., Cupolillo, E., Quintela, L.P., Madeira, M.F., Pacheco, R.S., Valette-Rosalino, C.M., Mendonça, S.C.F., 2007. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101, pp. 735–737.
- Barbosa-Santos, E.G.O., Marzochi, M.C.A., Urtado, W., Queiros, F., Chicarino, J., Pacheco, R.S., 1994. Leishmaniasis disseminated by *Leishmania braziliensis* in a mare (*Equus caballus*) immunotherapy and chemotherapy assays. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 89, 217–220.
- Barral, A., Barral-Netto, M., Almeida, R., de Jesus, A.R., Grimaldi Junior, G., Netto, E.M., Santos, I., Bacellar, O., Carvalho, E.M., 1992. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47, 587–592.
- Berman, J.D., 1997. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Diseases* 24, 684–703.
- Cupolillo, E., Grimaldi Jr., G., Momen, H., 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50, 296–311.
- Cupolillo, E., Brahim, L.R., Toaldo, C.B., de Oliveira-Neto, M.P., de Brito, M.E., Falqueto, A., de Farias, Naiff M., Grimaldi, G. Jr., 2003. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 3126–3132.
- De Bruijn, M.H.L., Barker, D.C., 1992. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica* 52, 45–58.
- Ferreira, G.A., Soares, F.C., Vasconcelos, S.A., Rodrigues, B.H., Werkhauser, R.P., de Brito, M.E., Abath, F.G., 2007. Discrimination of *Leishmania braziliensis* variants by kDNA signature produced by LSSP-PCR. *The Journal of Parasitology* 93, 712–714.
- Gontijo, B., de Carvalho, M.L., 2003. American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36, 71–80.
- Gontijo, C.M., da Silva, E.S., de Fuccio, M.B., de Sousa, M.C., Pacheco, R.S., Dias, E.S., Andrade Filho, J.D., Brazil, R.P., Melo, M.N., 2002. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Tropica* 81, 143–150.
- Grogl, M., Thomason, T.N., Franke, E.D., 1992. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47, 117–126.
- Hanafi, R., Barhoumi, M., Ali, S.B., Guizani, I., 2001. Molecular analyses of Old World *Leishmania* RAPD markers and development of a PCR assay selective for parasites of the *L. donovani* species Complex. *Experimental Parasitology* 98, 90–99.
- Ishikawa, E.A., Silveira, F.T., Magalhaes, A.L., Guerra junior, R.B., Melo, M.N., Gomes, R., Silveira, T.G., Shaw, J.J., 2002. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96, 111–121.
- Marsden, P.D., Lessa, H.A., Oliveira, M.R., Romero, G.A., Marotti, J.G., Sampaio, R.N., Barral, A., Carvalho, E.M., Cuba, C.C., Magalhães, A.V., Macêdo, V.O., 1998. Clinical observations of unresponsive mucosal leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59, 543–545.
- Marsden, P.D., 1990. Mucocutaneous leishmaniasis. *BMJ* 301, 656–657.
- Martinez, E., Alonso, V., Quispe, A., Thomas, M.C., Alonso, R., Pinerio, J.E., Gonzalez, A.C., Ortega, A., Valladares, B., 2003. RAPD method useful for distinguishing *Leishmania* species: design of specific primers for *L. braziliensis*. *Parasitology* 127, 513–517.
- Marzochi, M.C., 1992. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina* 63, 82–104.
- Marzochi, M.C., Marzochi, K.B.F., 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil—emerging anthrozoosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública* 10, 359–375.
- Matos, D.S., Azeredo-Coutinho, R.B., Schubach, A., Conceição-Silva, F., Baptista, C., Moreira, J.S., Mendonça, S.C., 2005. Differential interferon-gamma production characterizes the cytokine responses to *Leishmania* and *Mycobacterium leprae* antigens in concomitant mucocutaneous leishmaniasis and lepromatous leprosy. *Clinical Infectious Diseases* 40, 5–12.
- Mendonça, M.C., de Brito, M.E., Rodrigues, E.H., Bandeira, V., Jardim, M.L., Abath, F.G., 2004. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *The Journal of Infectious Diseases* 189, 1018–1023.
- Momen, H., Grimaldi Jr., G., Pacheco, R.S., Jaffe, C.L., McMahon-Pratt, D., Marzochi, M.C., 1985. Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to

- L. Major*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 34, 1076–1084.
- Navin, T.R., Arana, B.A., Arana, F.E., Berman, J.D., Chajon, J.F., 1992. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. The Journal of Infectious Diseases 165, 528–534.
- Oliveira, F.S., Píremez, C., Pires, M.Q., Brazil, R.P., Pacheco, R.S., 2005. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. Veterinary Parasitology 15, 219–227.
- Oliveira-Neto, M.P., Píremez, C., Rangel, E., Schubach, A., Grimaldi Junior, G., 1988. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 83, 427–435.
- Pacheco, R.S., Brito, C.M., Sarquis, O., Pires, M.Q., Borges-Pereira, J., Lima, M.M., 2005. Genetic heterogeneity in *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected triatomine vectors in northeastern Brazil: epidemiological implications. Biochemical Genetics 43, 519–530.
- Pacheco, P.S., Barbosa-Santos, E.G.O., Brito, C.M.M., Pires, M.Q., Marzochi, M.C.A., 1999. Epidemiological and genotypical mapping of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraguay. The Journal of Protozoology Research 9, 76–87.
- Pacheco, R.S., Martinez, J.E., Valderrama, L., Momen, H., Saravia, M.G., 1995. Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. Molecular and Biochemical Parasitology 69, 197–209.
- Romero, G.A., Lessa, H.A., Macedo, V.O., Carvalho, E.M., Marsden, P.D., 1996. Delayed skin healing of cutaneous leishmaniasis after clinical cure mucosal surfaces. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 29, 285.
- Saravia, N.G., Weigle, K., Segura, I., Giannini, S.H., Pacheco, R., Labrada, L.A., Gonçalves, A., 1990. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection-reactivation or reinfection? Lancet 336, 398–402.
- Sneath, P.H., Sokal, R.R., 1962. Numerical taxonomy. Nature 193, 855–860.
- Schriefer, A., Schriefer, A.L., Goes-Neto, A., Guimarães, L.H., Carvalho, L.P., Almeida, R.P., Machado, P.R., Lessa, H.A., Jesus, A.R., Riley, L.W., Carvalho, E.M., 2004. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American Tegumentary Leishmaniasis. Infection and Immunity 72, 508–514.
- Schubach, A. de O., Marzochi, K.B., Moreira, J.S., Schubach, T.M., Araujo, M.L., Vale, A.C., Passos, S.R., Marzochi, K.B., 2005. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 38, 213–217.
- Schubach, A., Haddad, F., Oliveira-Neto, M.P., Degraive, W., Píremez, C., Grimaldi Jr., G., Fernandes, O., 1998a. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. The Journal of Infectious Diseases 178, 911–914.
- Schubach, A., Marzochi, M.C., Cuzzi-Maya, T., Oliveira, A.V., Araujo, M.L., Oliveira, A.L., Pacheco, R.S., Momen, H., Conceição-Silva, F., Coutinho, S.G., Marzochi, K.B., 1998b. Cutaneous scars in American Tegumentary Leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 58, 824–827.
- Tojal Silva, A.C., Cupolillo, E., Volpini, A.C., Almeida, R., Sierra Romero, G.A., 2006. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. Tropical Medicine & International Health 11, 1388–1398.

### **3.2. Genetic polymorphism of *Leishmania (V.) braziliensis* isolates before and after therapeutic failure or reactivation of cutaneous lesions**

Artigo submetido ao periódico *Clinical Experimental Dermatology*

Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Pinto AGS, Barros JHS, Conceição-Silva F, Pimentel MIF, Pacheco RS. *Clinical Experimental Dermatology*.

O objetivo deste artigo foi verificar o polimorfismo genético na população de *L. (V.) braziliensis* em amostras pareadas provenientes de pacientes antes e após a falha terapêutica ou reativação das lesões de LTA após tratamento inicial bem sucedido com antimoniato de meglumina. Utilizamos o marcador LSSP-PCR em 15 pares de isolados. Após a análise fenética, as amostras foram agrupadas em quatro clusters. A similaridade genética intrapar foi de 100% em dois pacientes que foram agrupados no cluster 1. Nos demais pares, um maior ou menor polimorfismo foi observado, demonstrando diferenciação na estrutura da população parasitária original. Tais achados sugerem que o polimorfismo genético presente nos pares de isolados provenientes de um mesmo paciente pode estar relacionado à emergência de subpopulações parasitárias *in vivo* a partir de um inóculo policlonal ou a seleção pela exposição ao tratamento.

Este artigo responde aos objetivos (i) e (iii) e parcialmente ao objetivo (v) desta tese.

1  
2  
3 **Genetic polymorphism of *Leishmania (V.) braziliensis* isolates before and after**  
4 **therapeutic failure or reactivation of cutaneous lesions**  
5  
6  
7  
8  
9

10 C. Baptista\*, A.O. Schubach\*, M.F. Madeira\*, A.G.S. Pinto\*, J.H.S. Barros\*, F. Conceição-  
11 Silva<sup>o</sup>, M.I.F. Pimentel\*, R.S. Pacheco<sup>#</sup>  
12  
13  
14  
15  
16

17 \* *Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro*  
18 *Chagas, IPEC/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil*  
19  
20  
21

22 <sup>o</sup> *Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro,*  
23 *Brazil*  
24  
25  
26

27 <sup>#</sup> *Laboratório de Sistemática Bioquímica, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de*  
28 *Janeiro, Brazil*  
29  
30  
31  
32

33  
34  
35  
36 Correspondence: Dr. Cibele Baptista (C. Baptista), Laboratório de Vigilância em  
37 Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, IPEC/Fiocruz, Rio de  
38 Janeiro CEP 21040-900, Brazil. Fax: +55 21 38659541.  
39  
40  
41

42  
43 E-mail address: [cibele.baptista@ipec.fiocruz.br](mailto:cibele.baptista@ipec.fiocruz.br)  
44

45 Conflict of interest: none declared.  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Summary

**Background.** The drug of first choice for treatment of the american tegumentary leishmaniasis (ATL) is the pentavalent antimony but cases of therapeutic failure or lesion reactivation after successful initial treatment have been confirmed in endemic areas.

**Aim.** To investigate genetic polymorphism in *Leishmania (Viannia) braziliensis* population previously typed through isoenzyme electrophoresis, isolated in two different moments (before the beginning of treatment and after treatment failure to meglumine antimoniate or reactivation after successful initial treatment).

**Methods.** The variable region of amplified kDNA minicircles of *Leishmania (V) braziliensis* from 15 pairs of isolates obtained from cutaneous lesions, respectively, before (samples A) and after reactivation or therapeutic failure to treatment (samples B) were assessed using the polymorphic molecular marker LSSP-PCR

**Results.** Following the phenetic analysis the genetic profiles of the samples were grouped in four clusters. Only the isolates from two patients presented total identity (Simple Matching coefficient of similarity = 1). Most isolates presented similarity coefficients varying from 0.63 to 0.91. In this group of patients genetic polymorphisms could be observed indicating low similarity between the samples A and B.

**Conclusions.** The results demonstrate the existence of genetic polymorphism between the samples isolated before treatment and after reactivation or treatment failure, suggesting a possible differentiation of the structure of the original parasite population which could be involved in the mechanisms of resistance to treatment or reactivation of lesions in the ATL.

## Introduction

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is endemic in Latin America and its expansion has been associated to the urbanization process. In Brazil, the disease is widespread and presents regional particularities, such as the occurrence of severe forms and resistance to treatment. In the state of Rio de Janeiro *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main species involved in ATL cases.<sup>1</sup> The clinical manifestations of the ATL are very complex varying from the appearance of cutaneous lesions in areas exposed to the bite of Phlebotominae insects and with favorable response to therapy to the occurrence severe mucosal forms of difficult treatment.<sup>2</sup>

There are few drugs available for ATL treatment.<sup>3</sup> Trivalent antimony was introduced around a hundred years ago by Gaspar Vianna in 1912 and although it has limited administration, adverse side effects, variable response as far as clinical healing and recurrence, antimony is still the drug of first choice in the form of pentavalent antimonials.<sup>4</sup> In Brazil, it is used as meglumine antimoniate - Glucantime<sup>®</sup>.<sup>5</sup>

Response to the treatment of ATL is normally favorable but cases of therapeutic failure or clinical reactivation have been reported in some endemic areas. The therapeutic failure is defined by the absence of lesion epithelizations after treatment otherwise, reactivation is characterized by the reappearance of vesicles or papules on ATL cutaneous scars or around it which may happen months or years after initial clinical healing.<sup>6,7</sup> The emergence of drug resistance becomes a major challenge in leishmaniasis.<sup>8,9</sup> These challenges are enhanced with the occurrence of coinfection with HIV,<sup>10</sup> increased migration, changes in the environment, difficulties in controlling the epidemics, introduction of new species or emergence of subpopulations.<sup>11,12</sup>

1  
2  
3  
4 From 1998 to 2010, cases of reactivation and treatment failure in patients diagnosed  
5 with ATL in the Evandro Chagas Clinical Research Institute – Oswaldo Cruz Foundation  
6 (IPEC-Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil have been notified in 15% of the patients. The  
7 mechanism involved in the poor response to therapy in leishmaniasis remains unclear to  
8 date and monitoring of these cases may help to understand the factors associated with drug  
9 resistance.<sup>13</sup>  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16

17 Aiming at detecting genetic polymorphism among parasites from patients that  
18 presented these therapeutic failure or reactivation of cutaneous lesions, the technique of low  
19 stringency single specific primer - polymerase chain reaction (LSSP-PCR) was used in  
20 paired isolates of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in two different times: before  
21 beginning treatment for ATL and after treatment failure or reactivation.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

## 32 **Methods**

### 33 **Samples studied**

34 A descriptive study of 15 pairs of isolates of *Leishmania* sp. separated in two  
35 groups: samples A – isolates obtained from initial lesions (before treatment with  
36 pentavalent antimony) and samples B - isolated from lesions of patients with treatment  
37 failure to meglumine antimoniate or reactivation after successful initial treatment. All 15  
38 patients were diagnosed at IPEC-Fiocruz from 2002 to 2010.  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

48 The study was approved by the Research Ethics Committee of IPEC/Fiocruz under  
49 number 0016.0.009-02 and all patients signed a free informed consent form.  
50  
51  
52  
53  
54

### 55 **Isolation and *in vitro* culture**

56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Fragments of cutaneous lesions obtained by biopsy were collected aseptically and immediately immersed in saline solution containing antibiotics and antifungal (100U penicillin and 50µg of 5'fluorocytocine) and kept for 24 hours at 4°C. After this period, samples were fragmented and transferred to tubes containing Biphasic Novy- Nicolle-McNeal (NNN) culture medium and Schneider's culture medium enriched with Fetal Calf Serum, maintained at 28°C, during 30 days. Promastigotes were rapidly expanded (up to 6<sup>th</sup> passage) to obtain parasite pellet.

### Multilocus enzyme electrophoresis

The parasite homogenate was transferred to agarose gel (1%) and submitted to electrophoresis. A system of eight enzymatic loci was used for multilocus enzyme electrophoresis (MLEE): 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH, EC.1.1.1.43), phosphoglucose isomerase (GPI, EC.5.3.1.9), nucleoside hydrolase (NH, 2 loci, EC. 3.2.2.1), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC.1.1.1.49), malate dehydrogenase (MD, EC.1.1.1.37), malic enzyme (ME, EC.1.1.1.40), isocitrate dehydrogenase (IDHNADP, EC.1.1.1.42), and phosphoglucomutase (PGM, E.C.1.4.1.9). The enzymes, electrophoretic conditions and substrates for development were those described previously.<sup>14</sup> The gels were analyzed by determining the electrophoretic mobility of the bands based on the standard positions of the following reference strains: *Leishmania (Viannia) braziliensis* - MHOM/BR/75/M2903, *Leishmania (Leishmania) chagasi* - MHOM/BR/74/PP75, and *Leishmania (Viannia) guyanensis* - MHOM/BR/1975/M4147.

### PCR assay

1  
2  
3  
4 DNA was extracted from the samples according to protocols previously described  
5  
6 (Oliveira et al., 2005, Baptista et al, 2009). DNA was amplified using a pair of primers (BI:  
7  
8 5'-GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3' and B2: 5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3'),  
9  
10 directed against the variable region of kDNA minicircles (mitochondrial DNA) of  
11  
12 *Leishmania braziliensis* complex species (*Viannia* subgenus).  
13  
14

### 17 LSSP-PCR

18  
19  
20 Fragments of 750-bp of kDNA of *L (V) braziliensis* obtained by PCR were purified  
21  
22 using Wizard PCR Preps system (Promega®) following manufacturer's instructions.  
23  
24

25 LSSP-PCR reaction was carried out from the amplification of the 750bp fragment  
26  
27 with a single specific primer using the sequence 5'-GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3'.<sup>15</sup>  
28

29 Amplification was performed like previously described.<sup>26</sup> The amplification  
30  
31 products were analyzed on 2% agarose gel or 1.8% agarose (Sigma®) gel visualized with  
32  
33 ethidium bromide under UV light. Reproducibility of LSSP-PCR method was assessed  
34  
35 after three repetitions under identical conditions with retention of observed profiles.  
36  
37  
38  
39  
40

### 41 Numerical (phenetic) analysis

42  
43  
44 LSSP-PCR bands varying from 200 to 750bp were compared using the Simple  
45  
46 Matching coefficient of similarity to determine the proportion of mismatched bands  
47  
48 between pairs of isolates. The similarity matrix was transformed into a dendrogram using  
49  
50 the UPGMA algorithm. Phenetic analysis was performed with the NTSYS-pc program  
51  
52 (version 2.02, Exeter Software, Setauket, NY, USA).  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Results

All patients presented ATL cutaneous form. Eleven presented 1 to 3 lesions, two patients with 5 to 6 lesions, and two others presenting disseminated cutaneous leishmaniasis. The time elapsed between the obtainment of each pair of isolates ranged from 5 months to 28 months. Treatment failure occurred in four patients (2, 3, 4 and 7) and the others showed reactivation after successful initial treatment (Table 1). Except one patient which received 10mg/Kg/day on the first treatment (patient 1), the others received low doses of antimony pentavalente (5mg/kg/day) with continuous or intermittent schedules or also intralesional injection (patients 4, 5, 6, 7, 10 and 12). All patients were retreated with repetition of the first therapeutic schemes. Five patients (1, 4, 7, 9 and 10) required one third treatment with drugs of second line. Only one patient (patient 3) abandoned treatment. The others presented healing of the lesions after final retreatment.

All isolates were taxonomically classified as *L. (V.) braziliensis* by isoenzyme electrophoresis. No isoenzymatic variants were observed between parasites isolated from samples A and B.

In all samples, the 750pb diagnostic band was detected through PCR from the amplification of the variable region of kDNA minicircles. The samples analyzed by LSSP-PCR presented genetic polymorphism showing profiles with different degree of complexity (Fig. 1).

After analysis of a total of 12 bands, the samples were grouped into four clusters. Isolate 13A shared 100% characters in common with the reference strain of *L. (V.) braziliensis*. Intrapair genetic similarity (A and B) was 100% in pairs of isolates 2 and 3. The similarity of the others ranged from 0,63 to 0,91. The pairs of isolates genetically more

1  
2  
3 differentiated were 5, 6, 12 and 14, whose A and B isolates were grouped in different  
4  
5 clusters (Fig. 2).  
6  
7

## 10 Discussion

11  
12 Molecular biology techniques are useful tools for species identification and analysis  
13 of genetic diversity in epidemiological studies of pathogenicity and drug resistance. Genetic  
14 polymorphisms have been detected in samples from patients with typical and atypical  
15 clinical manifestations of ATL, including parasites from lesions after reactivation.<sup>16,17</sup>  
16  
17 Kumar *et al.*<sup>18</sup> reported a high rate of genetic polymorphism among parasite isolates from  
18 patients failing therapy treatment in cases of human visceral leishmaniasis, which may  
19 indicate conversion of parasite naturally sensitive to drugs to the resistant condition, or  
20 even the *in vivo* selection of mixed populations.<sup>19</sup>  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

31 To our knowledge, this is the first work to report LSSP-PCR analysis in paired  
32 isolates from the same lesion of patients with ATL acquired before the beginning of  
33 treatment and after treatment failure or reactivation of the cutaneous lesion. In Brazil, the  
34 therapeutic response to antimonials is considered favorable in most leishmaniasis cases,  
35 with variable healing rates. However, treatment failure in visceral leishmaniasis and  
36 cutaneous and mucocutaneous forms seem to be increasing in intensity and prevalence,  
37 becoming common problems in many endemic areas.<sup>2,20,21</sup>  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

48 Our research group has been detecting cases of reactivation and therapeutic failure  
49 in patients treated in the State of Rio de Janeiro. It is known that reactivation can occur in  
50 16% of cases under leishmaniasis treatment.<sup>22</sup> In addition, the persistence of parasites may  
51 be detectable months or years after treatment, in blood and ATL scars also showing parasite  
52 viability.<sup>2,23,24</sup>  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Possible proposals for the issue of clinical failure or parasitological persistence and the inconsistency of the therapeutic responses to treatment with pentavalent antimony may be linked to inherent resistance of parasite to antimony, failures of the host related to its immunity and physiology and pharmacokinetics of the drug. On the other hand, the capacity that some individual present to control infection and parasite replication without apparent clinical disease progression, may be the result of a good modulation of immune response.<sup>25</sup> History of previous or irregular treatment to leishmaniasis, presence of three or more lesions, long time of evolution of the disease and also the presence of comorbidities may be associated to therapeutic failure.<sup>21</sup> However, other factors can be involved in same cases of therapeutic failures without presence of these conditions.

In this study, all patients presented clinical manifestations of cutaneous leishmaniasis. Only two patients presented disseminated cutaneous lesions and their isolates (15 and 9) were grouped in clusters 2 and 3, respectively. All accompanied patients obtained clinical healing after retreatment. Five patients experienced clinical cure after final retreatment with second choice drugs (amphotericin B and pentamidine) of whose three patients received initial treatment with intralesional injections. The others patients were cured with repetition of the first therapeutic scheme. Treatments using low doses or alternative schedules of antimony have been demonstrated successes, especially in patients with comorbidities, children or elderly people where high doses could be potentially more toxic.<sup>22</sup>

The molecular marker used in the present study is considered highly polymorphic and has been used in investigations of intrapopulational genetic variability as an important tool to demonstrate polyclonality and tropism of parasite populations.<sup>15</sup> Previous results using LSSP-PCR also confirmed intrapopulational genetic variability, distinguishing

1  
2  
3 between two isolates from the same patient before and after reactivation.<sup>16</sup> In the present  
4 study 13.33% (4/30) of the samples showed similarity index equal to 1, which includes the  
5 pairs of isolates from patients 2 and 3 (A and B). Such pair of isolates was obtained from  
6 patients presenting therapeutic failure after 7 months (patient 3) and 14 months (patient 2).  
7  
8 Two out of four patients that presented therapeutic failure were grouped in the cluster 1 and  
9 the others in the cluster 3. The time between the first and second isolation ranged from 18  
10 to 21 months, suggesting that the elapsed time in different phases of clinical development  
11 may influence the genetic profiles detected. In the other samples a greater or lesser  
12 intrapair similarity could be detected with greater genetic diversity observed in isolates 4,  
13 5, 6, 12 and 14.  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

26  
27 Different parasite subpopulations may be involved in the transmission cycle of  
28 leishmaniasis and the emergence of more resistant populations or able to cause atypical  
29 clinical manifestations should be detected in an attempt to control such eventual cases.<sup>19</sup>  
30  
31 The four clusters assessed in this study grouped isolates from patients with reactivation  
32 after successful initial treatment. These results suggest that the polymorphism existing  
33 between pairs of isolates from the same patient may be related to the *in vivo* emergence of  
34 subpopulation from a polyclonal inoculum or from selection by exposure to treatment.<sup>12,19</sup>  
35  
36 The differentiation in the structure of the original parasite population could be involved in  
37 the resistance mechanisms to treatment or lesions reactivation in the LTA. Further  
38 molecular studies added to *in vitro* sensitivity phenotype to pentavalent antimony and  
39 immunological mechanisms of the host could be useful tools for a better understanding of  
40 these human cases of initial treatment failure or clinical recurrence of ATL.  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Acknowledgements

This work was funded by Instituto Kinder do Brasil (IKB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). C.Baptista benefited from funding by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino). A.O Schubach and RS Pacheco are investigators of CNPq and Faperj, Brazil. We thank the Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (VigiLeish-IPEC/FIOCRUZ) for providing biopsies of ATL patients.

### References

- 1 Marzochi MC, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública* 1994; **10**: 359-375.
- 2 Schubach A, Marzochi KB, Moreira JS *et al.* Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; **38**: 213-217.
- 3 Chakravarty J, Sundar S. Drug resistance in leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2010; **2**: 167-76.
- 4 Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*. 2009; **30**: 2317-36.
- 5 Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem* 2007; **14**:1153-69.

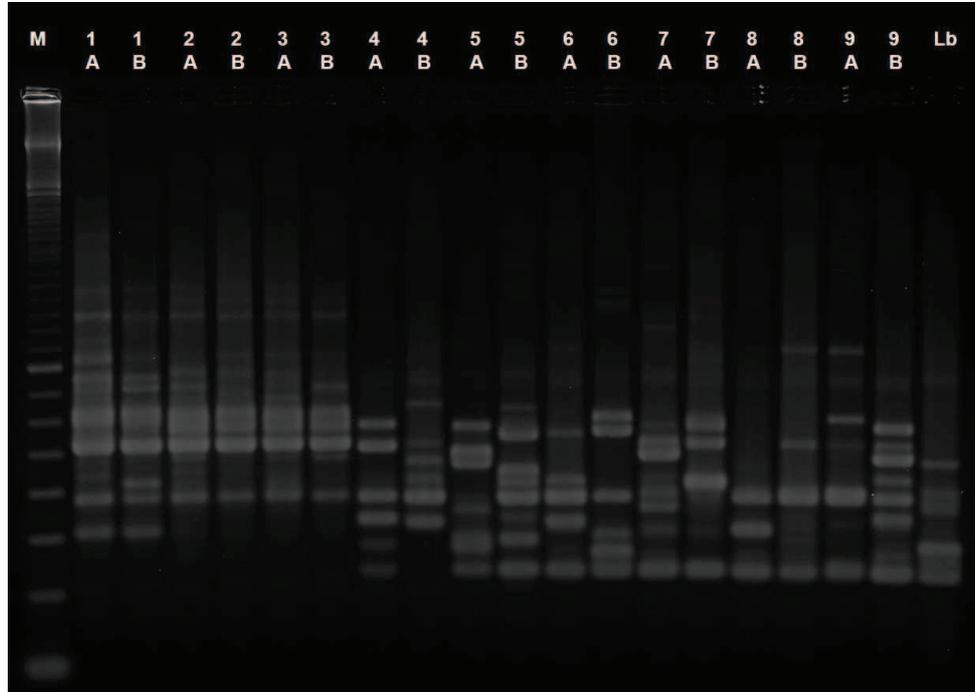
- 1  
2  
3  
4 6 Ministério da Saúde (Brasil). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar  
5 Americana, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde;  
6 2010.  
7  
8  
9  
10 7 Oliveira-Neto MP, Mattos M, Souza CS *et al.* Leishmaniasis recidiva cutis in New  
11 World cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Dermatol* 1998; **37**: 846–849.  
12  
13  
14  
15 8 Guerin PJ, Olliaro P, Sunder S *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control,  
16 diagnosis and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet*  
17 *Infect Dis* 2002; **2**: 494–501.  
18  
19  
20  
21  
22 9 Sundar S, More DK, Singh MK *et al.* Failure of pentavalent antimony in visceral  
23 leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis*  
24 2000; **31**: 1104–1106.  
25  
26  
27  
28  
29 10 Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS:  
30 the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 2008; **21**:334-59.  
31  
32  
33  
34 11 Sereno D, Cordeiro da Silva A, Mathieu-Daude F *et al.* Advances and perspectives in  
35 Leishmania cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int.* 2007; **56**: 3-7.  
36  
37  
38  
39 12 Pacheco RS, Martinez JE, Valderrama L *et al.* Genotypic polymorphisms in  
40 experimental metastatic dermal leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol* 1995; **69**: 197-  
41 209.  
42  
43  
44  
45  
46 13 Ponte-Sucre A. Physiological consequences of drug resistance in Leishmania and their  
47 relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biol Dis* 2003; **28**: 14.  
48  
49  
50  
51 14 Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New World  
52 Leishmania using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 1994; **50**:296-311.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 15 Ferreira GA, Soares FC, Vasconcellos SA *et al.* Discrimination of *Leishmania*  
5  
6 braziliensis variants by kDNA signatures produced by LSSP-PCR. *J Parasitol* 2007;  
7  
8 **93**: 712-4.  
9
- 10 16 Baptista C, Schubach AO, Madeira MF *et al.* *Leishmania* (Viannia) braziliensis  
11  
12 genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of  
13  
14 tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Exp Parasitol* 2009;  
15  
16 **121**: 317-22.  
17
- 18 17 Oliveira FS, Valette-Rosalino CM, Schubach Ade O *et al.* kDNA minicircle signatures  
19  
20 of *Leishmania* (Viannia) braziliensis in oral and nasal mucosa from mucosal  
21  
22 leishmaniasis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; **66**: 361-5.  
23  
24
- 25 18 Kumar A, Boggula VR, Sundar S *et al.* Identification of genetic markers in sodium  
26  
27 antimony gluconate (SAG) sensitive and resistant Indian clinical isolates of *Leishmania*  
28  
29 donovani through amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Acta Trop* 2009;  
30  
31 **110**: 80-5.  
32  
33
- 34 19 Laurent T, Rijal S, Yardley V *et al.* Epidemiological dynamics of antimonial resistance  
35  
36 in *Leishmania donovani*: genotyping reveals a polyclonal population structure among  
37  
38 naturally-resistant clinical isolates from Nepal. *Infect Genet Evol* 2007; **7**: 206-12.  
39  
40  
41
- 42 20 Unger A, O'Neal S, Machado PR *et al.* Association of treatment of American cutaneous  
43  
44 leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil.  
45  
46 *Am J Trop Med Hyg* 2009 **80**:574-9.  
47  
48
- 49 21 Rodrigues AM, Hueb M, Santos TA *et al.* Factors associated with treatment failure of  
50  
51 cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;  
52  
53 **39**: 139-45.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
- 22 Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M *et al.* 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**: 651–655.
- 23 Vergel C, Palacios R, Cadena H *et al.* Evidence for leishmania (viannia) parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. *J Infect Dis* 2006; **194**:503-11.
- 24 Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T *et al.* Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg* 1998; **58**: 824-7.
- 25 Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R *et al.* T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 625-30.

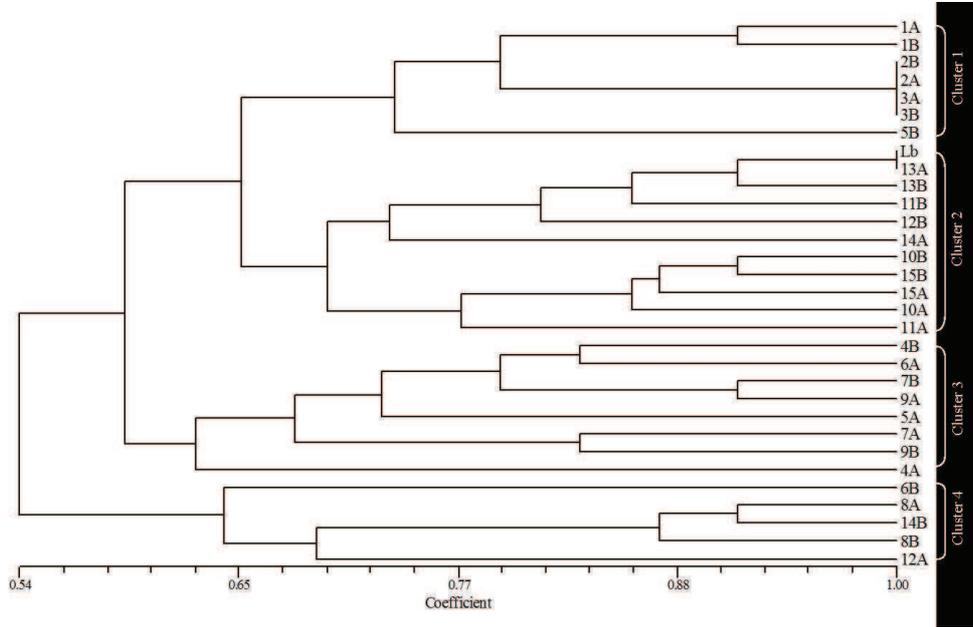
**Table 1** Data from 15 patients with ATL with failure to treatment or reactivation. CL (cutaneous leishmaniasis), DiCL (disseminated cutaneous leishmaniasis).

Patient and isolate number	Clinical form/ n° of lesions	Time between first and second isolation (months)	Condition after first treatment	Drug used in the final retreatment
1 A	CL	6	Reactivation	Pentamidine
1 B	1			
2 A	CL	14	Treatment failure	Glucantime
2 B	5			
3 A	CL	7	Treatment failure	Abandon
3 B	2			
4 A	CL	21	Treatment failure	Anphotericin B
4 B	1			
5 A	CL	10	Reactivation	Glucantime
5 B	6			
6 A	CL	5	Reactivation	Glucantime
6 B	2			
7 A	CL	18	Treatment failure	Anfotericina B
7 B	1			
8 A	LC	10	Reactivation	Glucantime
8 B	2			
9 A	DiCL	13	Reactivation	Anfotericina B
9 B	Many			
10 A	CL	13	Reactivation	Anfotericina B
10 B	1			
11 A	CL	6	Reactivation	Glucantime
11 B	1			
12 A	CL	19	Reactivation	Glucantime
12 B	2			
13 A	CL	10	Reactivation	Glucantime
13 B	3			
14 A	CL	27	Reactivation	Glucantime
14 B	1			
15 A	DiCL	13	Reactivation	Glucantime
15 B	Many			



**Figure 1** Representative genetic profiles of samples generated by LSSP-PCR. M: 100 base pairs, Lb: *L. (V.) braziliensis* - MHOM/BR/75/M2903), 1-8: isolates from the initial lesion (A) and isolates from the recurrent lesion (B). More divergent genetic profiles are observed in isolates 4 – 8.  
210x150mm (150 x 150 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



**Figure 2** UPGMA dendrogram based on the LSSP-PCR profiles of samples isolated from lesion before treatment (A) and after reactivation (B). Lb: *L. (V.) braziliensis* reference strain.  
229x147mm (150 x 150 DPI)

Review

### **3.3. American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* resistant to meglumine antimoniate and with good response to pentamidine: a case report**

**Artigo aceito para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**

Pimentel MIF, Baptista C, Rubin EF, Vasconcellos ECF, Lyra1 MR, Salgueiro MM, Saheki1 MN, Rosalino CMV, Madeira MF, Silva AF, Confort EM, Schubach AO. American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* resistant to meglumine antimoniate and with good response to pentamidine: a case report. *Rev Sob Bras Med Trop*, 2011. *In press*.

Neste artigo relatamos um caso de um militar brasileiro com leishmaniose cutânea, cuja lesão reativou após dois tratamentos sistêmicos com antimoniate de meglumina. O tratamento com anfotericina B foi interrompido por intolerância à medicação. Neste momento, isolados de *Leishmania* sp. foram obtidos. Seis infiltrações intralesionais de antimoniate de meglumina foram administradas sem resposta. Um novo isolamento parasitário foi obtido. Parasitos provenientes da primeira e segunda biópsias foram identificados como *Leishmania (Viannia) braziliensis* por MLEE e avaliados quanto à sensibilidade *in vitro* ao antimonial pentavalente. O paciente após tratamento intramuscular com pentamidina (4mg/kg) apresentou cura e a lesão não reativou. Os parasitos isolados na primeira biópsia apresentaram maior sensibilidade ao antimoniate de meglumina do que os da segunda biópsia sugerindo que o regime terapêutico possa ter influenciado este resultado.

Este artigo responde ao objetivo (i) e parcialmente ao objetivo (iv) desta tese.

## CASE REPORT 643-37484

**American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*  
resistant to meglumine antimoniate and with good response to pentamidine: a case  
report**

Leishmaniose cutânea americana causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*  
resistente ao antimoniato de meglumina e com boa resposta terapêutica à pentamidina:  
relato de um caso

**Running Title:** Cutaneous leishmaniasis responsive to pentamidine

**Maria Inês Fernandes Pimentel<sup>1</sup>, Cibele Baptista<sup>1</sup>, Évelyn Figueiredo Rubin, Érica  
de Camargo Ferreira e Vasconcellos<sup>1</sup>, Marcelo Rosandiski Lyra<sup>1</sup>, Mariza de Matos  
Salgueiro<sup>1</sup>, Maurício Naoto Saheki<sup>1</sup>, Cláudia Maria Valete Rosalino<sup>1</sup>, Maria de  
Fátima Madeira<sup>1</sup>, Aline Fagundes da Silva<sup>1</sup>, Eliame Mouta Confort<sup>1</sup> and Armando  
de Oliveira Schubach<sup>1</sup>**

---

1. Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação  
Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

**Address to:** Dra. Maria Inês Fernandes Pimentel. Lab. Vigilância em Leishmanioses/IPEC/FIOCRUZ.  
Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Phone: 55 21 3865-9673; Fax: 55 21 3865-9541

e-mail: [maria.pimentel@ipec.fiocruz.br](mailto:maria.pimentel@ipec.fiocruz.br)

## RESUMO

Relatamos um caso de um militar brasileiro com leishmaniose cutânea, cuja lesão reativou após dois tratamentos sistêmicos com antimoniato de meglumina. Foi tratado com anfotericina B, mas precisou interromper por intolerância à medicação. Após isolamento de *Leishmania* sp.,

seis infiltrações intralesionais de antimoniato de meglumina foram realizadas, sem resposta. Promastigotas de *Leishmania* sp. foram novamente isoladas. Foi submetido a tratamento intramuscular com pentamidina (4mg/kg). Parasitos da primeira e segunda biópsias foram identificados como *Leishmania (Viannia) braziliensis*; os da primeira biópsia eram mais sensíveis ao antimoniato de meglumina *in vitro* do que os da segunda biópsia. A lesão não reativou.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose cutânea. Terapêutica. Resistência medicamentosa.

## ABSTRACT

We report a case of a Brazilian soldier with cutaneous leishmaniasis. Lesion relapsed after two systemic treatments with meglumine antimoniate. The patient was treated with amphotericin B, interrupted due to poor tolerance. After isolation of *Leishmania* sp., six intralesional infiltrations of meglumine antimoniate resulted in no response. *Leishmania* sp. promastigotes were again isolated. Patient was submitted to intramuscular 4mg/kg pentamidine. Parasites from the first and second biopsy were identified as *Leishmania (Viannia) braziliensis*; the ones from the first biopsy were more sensitive to the meglumine antimoniate *in vitro* than those isolated from the second biopsy. No relapse was observed.

**Keywords:** Cutaneous leishmaniasis. Therapeutics. Drug resistance.

## INTRODUCTION

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is a disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. Several wild and domestic animals serve as reservoirs of the parasite and humans are the secondary host. Transmission occurs through the bite of different species of phlebotomine sand flies, which vary according to the geographical region. The incubation period ranges from few days to several months. The disease often manifests as a papule that evolves into a nodule and frequently ulcerates with a distinctive infiltrated border. Primary lesion is usually solitary, but more than one lesion might be observed<sup>1</sup>.

*Leishmania (Viannia) braziliensis* is widely distributed in Brazil and is mainly responsible for cutaneous leishmaniasis (CL) and for occasional mucosal or mucocutaneous presentations. The last two forms are associated with significant morbidity<sup>1</sup>.

Pentavalent antimonials ( $Sb^{5+}$ ) are considered to be the first-choice drugs. In Brazil, a daily dose of 10 to 20mg/kg  $Sb^{5+}$  administered for 20 days is recommended for CL. If no remission is observed, a second treatment is administered for 30 days. In the absence of a therapeutic response, the second drug of choice (amphotericin B) is used. The third drug of choice is pentamidine<sup>1</sup>. All of these medications are parenterally administered and may result in mild to

severe side effects. Pentavalent antimonials can cause hyperamylasaemia, ECG abnormalities, bone marrow suppression and hepatotoxicity, as well as constitutional symptoms such as myalgia, arthralgia, headache, fever, nausea, vomiting, and pain at the site of drug application (when intramuscularly)<sup>1,2</sup>. Amphotericin B may result in anaemia, cardiac and nephrotoxic effects, hypokalaemia, and constitutional side effects such as nausea, vomiting, phlebitis, shivering and fever<sup>1</sup>, which sometimes require the interruption of treatment. Pentamidine is known for its cardiac toxicity, nephrotoxicity, hypotension, hypoglycaemia, but the major concern is the possibility of development of diabetes mellitus<sup>1</sup>.

We report a case of CL caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a Brazilian soldier, who probably acquired the disease in Ecuador during a military mission. The lesion was unresponsive to two complete courses of pentavalent antimonials and to six intralesional applications of the drug. The patient did not tolerate two different forms of amphotericin B (desoxycholate and liposomal), which caused constitutional symptoms. The lesion finally receded after treatment with 2.4g of pentamidine with few side effects.

## **CASE REPORT**

A 35 year-old white male military officer, with a weight of 77kg and living in Rio de Janeiro, Brazil, had been in Ecuador between May 2005 and June 2006 in a military mission. In March 2006, a furunculoid lesion arose on his right arm, which was treated with antibiotics. The lesion increased in diameter and ulcerated, and the diagnosis of CL was made (imprint positive for the parasite). Patient was treated with pentavalent antimonial (meglumine antimoniate 10mL/day for 30 days - approximately 10mg/kg Sb<sup>5+</sup> per day), which resulted in apparent resolution of the lesion. Twenty days later, the lesion ulcerated again. Back to Brazil, the patient was submitted to a second treatment with meglumine antimoniate at the same dose for 30 days, with apparent healing of the lesion. Twenty days later, the lesion ulcerated again.

Next, patient received 25mg of amphotericin B desoxycholate, but he did not tolerate the drug (due to high fever, malaise, headache, chills). New treatment with liposomal amphotericin B was initiated, but as the cumulative dose increased, the patient did not tolerate this drug either (again due to moderate fever, chills, myalgia, tachypnea, tachycardia, nausea, hypotension during infusion). In an attempt to minimize adverse effects, time of infusion was increased to 4h, and 100mg of hydrocortisone during infusion and oral dipyron each 6h were used, however with increasing cumulative dose the adverse effects have become more frequent and more severe, thus leading to the suspension of the drug. A total dose of 0.775g of amphotericin B was administered over a 16-day period.

In August 2006, the patient still presented an ulcerated lesion on his right arm (**Figure 1**), but otherwise was in general good health. Immunoenzymatic assay for *Leishmania* was positive and the cutaneous Montenegro reaction was 12mm. A new skin biopsy was obtained, and *Leishmania* sp. promastigotes were isolated by culture in NNN medium. Six attempts of intralesional injections of meglumine antimoniate at 2-week intervals were then made, but the patient developed contact eczema throughout the lesion and the surrounding skin area, after the last application. The lesion was still ulcerated and crusted (**Figure 2**). A new biopsy was obtained and *Leishmania* sp. promastigotes were again isolated. In March 2007, the patient was treated with intramuscular pentamidine isethionate at a daily dose of 4mg/kg on alternate days, receiving a cumulative dose of 2.4g over a 23-day treatment, with a brief interruption of one week due to pain and haemorrhage at the site of injection.

Both isolates obtained during treatment with pentavalent antimonials were characterized as *Leishmania (V.) braziliensis* by isoenzyme electrophoresis<sup>3</sup>. In parallel, promastigote forms in the late log phase of growth were tested *in vitro* for sensitivity to meglumine antimoniate (Aventis-Pharma, São Paulo)<sup>4</sup>. The results showed a relevant difference between isolates, with the first isolate presenting an inhibitory concentration for 50% (IC<sub>50</sub>) of  $0,26 \pm 0,0$ mg/mL and the second presenting an IC<sub>50</sub> of  $2,10 \pm 0,16$ mg/mL.

No laboratory alterations were detected during and after treatment with pentamidine isethionate. The patient was negative for HIV 1 and 2 and HTLV-1. The lesion remained healed after a 34-month follow-up (**Figure 3**).

## DISCUSSION

Cutaneous leishmaniasis is a common condition among soldiers involved in military campaigns in endemic areas. Military excursions to the Amazon region play a relevant role in the local incidence of the disease<sup>5</sup>.

Success rates reported in the literature for the recommended doses of pentavalent antimonials vary widely. Many factors may influence the outcome of treatment, including drug subdoses and irregular treatment<sup>6</sup>, and the immune status of the host, with more common failures in HIV-positive patients<sup>7</sup>.

Several mechanisms have been suggested to be involved in the drug resistance of parasites. It is known that species causing leishmaniasis respond differently to treatment with pentavalent antimonials. Furthermore, some *Leishmania* populations may develop resistance to these drugs, probably as a result of natural clone selection<sup>8</sup>. *In vitro* sensitivity testing of the parasites isolated after the two intramuscular treatments and after the six intralesional injections of antimonials revealed differences between isolates. According to Azeredo-Coutinho et al<sup>9</sup>, L.

(V.) *braziliensis* strains presented IC50 values varying from 0.8 to 9.5mg/mL, and the strains isolated from patients poorly responsive to therapy had significantly higher IC50 values than those isolated from patients who were cured after completion of the first antimonial treatment<sup>9</sup>. In the present study, the parasites isolated from the first biopsy were more sensitive to antimonials (0.26mg/mL) than those isolated after intralesional treatment (2.10mg/mL), a finding suggesting the development of resistance to the drug after successive cycles of treatment. This resistance was confirmed both *in vitro* and *in vivo*. These results suggest that even the appropriate therapeutic regimen can induce resistance of the parasite.

Amphotericin B has been recognized as an effective drug for the treatment of leishmaniasis, but is sometimes poorly tolerated. In Brazil, amphotericin B is the second drug of choice for the treatment of CL in the case of failure or contraindication to pentavalent antimonials<sup>1</sup>. Liposomal amphotericin B is associated with a lower frequency of side effects, but its high cost and the need for intravenous administration limit its use. The present patient did not tolerate any of the two forms of amphotericin B due to constitutional symptoms, although the total dose of the drug applied was 0.775g, approximately half the dose indicated for the treatment of CL<sup>1</sup>.

Pentamidine has been gradually accepted in several Latin American countries as an excellent alternative to pentavalent antimonials, and has been recommended as the drug of choice for the treatment of CL in some of them<sup>10</sup>. The drug is highly effective and side effects are generally well tolerated, with pain at the site of drug injection, nausea, fever and bitter taste being the most frequent symptoms<sup>10</sup>. Hypotension and hypoglycaemia have been reported, as well as the induction of diabetes mellitus<sup>1</sup>. Therefore, monthly serum glucose monitoring during 6 months has been recommended after the administration of a pentamidine cumulative dose higher than 1.0g<sup>1</sup>. Several studies have compared the efficacy of pentavalent antimonials and pentamidine and some of them demonstrated a better performance of the latter<sup>10</sup>.

Our patient tolerated well the administration of pentamidine and the outcome was satisfactory. The patient presented no laboratory alterations during post-treatment follow-up and was lesion-free 34 months after the end of treatment.

#### **FINANCIAL SUPPORT**

This study was supported by the Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro (convênio RJ/FIOCRUZ), FIOCRUZ, FAPERJ, CNPq, and PAPES4/FIOCRUZ.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

The contributing authors declare no conflict of interest.

**REFERENCES**

1. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª ed. atualizada. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
2. Aronson NE, Wortmann GW, Johnson SC, Jackson JE, Gasser Jr RA, Magill AJ, et al. Safety and efficacy of intravenous sodium stibogluconate in the treatment of leishmaniasis: recent U. S. military experience. *Clin Infect Dis* 1998; 27:1457-1464.
3. Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50:296-311.
4. Machado GM, Leon LL, De Castro SL. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102:73-77.
5. Guerra JAO, Talhari S, Paes MG, Garrido M, Talhari JM. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar Americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36:587-590.
6. Rodrigues AM, Hueb M, Santos TARR, Fontes CJF. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniatos de meglumina. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39:139-145.
7. Barratt G, Legrand P. Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of amphotericin B used in treatment of leishmaniasis. *Curr Op Infect Dis* 2005; 18:527-530.
8. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:111-126.
9. 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; 93:688-693.
10. Lai A Fat EJSK, Vrede MA, Soetosenojo RM, Lai A Fat RFM. Pentamidine, the drug of choice for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Surinam. *Int J Dermatol* 2002; 41:796-800.

**Figure Legends**

**FIGURE 1 - Clinical aspect when the first biopsy was done, 2006 August. Ulcerated lesion in the right arm with purulent crusts.**



**FIGURE 2 - Clinical aspect when the second biopsy was done, 2007 February. Ulcerated lesion and purulent crusts in the periphery of atrophic scar in the right arm.**



**FIGURE 3 - Atrophic scar 34 months after treatment with pentamidin.**



3.4. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: avaliação da sensibilidade *in vitro* ao antimonial pentavalente, comparando isolados pareados obtidos antes e após o insucesso terapêutico na Leishmaniose Tegumentar Americana

Manuscrito em preparação para submissão ao *Tropical Medicine and International Health*

Baptista C, Leon LL, Miranda LFC, Madeira MF, Conceição-Silva F, Barros JHS, Pinto AGS, Schubach AO. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: avaliação da sensibilidade *in vitro* ao antimonial pentavalente, comparando isolados pareados obtidos antes e após o insucesso terapêutico na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Tropical Medicine and International Health*.

Com base nos resultados moleculares obtidos anteriormente, visamos neste artigo, avaliar a sensibilidade *in vitro* de *L. (V.) braziliensis*, isoladas de pacientes com LTA, antes (amostra A) e após a falha terapêutica ou reativação após tratamento inicial bem sucedido com antimoniato de meglumina (amostra B). Sete pares de isolados sob as formas promastigotas e amastigotas intracelulares foram expostos à diferentes concentrações de antimônio pentavalente. Com uma única exceção, os resultados com formas promastigotas demonstraram que as amostras B apresentaram valores da IC<sub>50</sub> mais elevadas que as amostras A, tanto em 24 como em 48 horas de exposição à droga. Nos testes com formas amastigotas observamos que dos 7 pares de isolados, quatro pacientes apresentaram valores da IC<sub>50</sub> maior para as amostras B do que para A. Sob as condições do nosso estudo, formas promastigotas e amastigotas foram sensíveis ao glucantime, sem presença de correlação dos resultados de sensibilidade *in vitro* entre formas promastigotas e amastigotas em quatro dos sete pacientes estudados.

Este artigo responde aos objetivos (i), (iv) e (v) desta tese.

***Leishmania (Viannia) braziliensis*: avaliação da sensibilidade *in vitro* ao antimonial pentavalente, comparando isolados pareados obtidos antes e após o insucesso terapêutico na Leishmaniose Tegumentar Americana**

**C Baptista, LL Leon, LFC Miranda, MF Madeira, F Conceição-Silva, JHS Barros, AGS Pinto, AO Schubach**

C. Baptista *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis*: avaliação da sensibilidade *in vitro* ao antimonial pentavalente

**Resumo**

Na Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), a variabilidade da resposta ao tratamento antimonial pode estar condicionada a fatores relacionados ao hospedeiro, aos parasitos ou mesmo aos esquemas terapêuticos empregados. O objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade *in vitro* de amostras pareadas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, isoladas antes (A) e após falha terapêutica ou reativação da LTA após resposta favorável inicial ao antimoniato de meglumina (B) de pacientes com Leishmaniose Tegumentar. Nos ensaios, formas promastigotas e amastigotas intracelulares foram expostas a diferentes concentrações de Glucantime<sup>®</sup>. Sete pares de amostras (A e B), isoladas respectivamente, antes e após o tratamento foram estudadas. Formas promastigotas, na maioria dos pares estudados, a IC<sub>50</sub> obtida para as amostras B apresentou valores mais elevados do que as amostras A. Nas formas amastigotas, os valores da IC<sub>50</sub> variaram de 11,7 a 44,3µg/mL para a amostra A e de 13,7 a 52,7µg/mL para a amostra B. Em três pacientes observou-se aumento de 17 a 20% na IC<sub>50</sub> nas amostras B em relação a A. Isolados provenientes de um paciente apresentaram um aumento de 100% na IC<sub>50</sub> *in vitro* nas amostras B. Estes resultados sugerem que os isolados obtidos após o insucesso terapêutico ou reativação da LTA podem ser mais resistentes ao antimonio pentavalente em ensaios *in vitro*. Dos sete pacientes estudados, um abandonou o tratamento e seis apresentaram cura, após retratamento, pelo uso da Anfotericina B (4 casos) ou antimoniato de meglumina (2 casos). Não foi possível

correlacionar os resultados obtidos neste estudo com a clínica ou à resposta ao tratamento.

## **Introdução**

As leishmanioses são doenças infectoparasitárias causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas através da picada de insetos vetores, conhecidos como flebotomíneos, determinando significativa mortalidade e morbidade em países em desenvolvimento (Marzochi and Marzochi, 1994; W.H.O., 2008). No Brasil a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) ocorre em todos os estados da federação e a infecção apresenta manifestações clínicas e modelos ecoepidemiológicos bem variados (Shaw 2003). *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal espécie envolvida no ciclo de transmissão da LTA, causando a forma cutânea, mucosa e mucocutânea da doença (Marzochi 1992, Oliveira-Neto *et al.* 2000, Schubach *et al.* 2005).

Os antimoniais pentavalentes são os fármacos de primeira escolha para o tratamento da LTA. O Ministério da Saúde – Brasil preconiza a dose de 10-20 mg/Sb<sup>v</sup>/Kg/dia durante 20 dias, no tratamento da forma cutânea e cutânea disseminada da LTA. Há vários anos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas / Fundação Oswaldo Cruz (IPEC/FIOCRUZ), no Rio de Janeiro, Brazil, utiliza-se a dose de 5mg/Sb<sup>v</sup>/Kg/dia, após a constatação que pacientes submetidos a doses baixas (5mg/Sb<sup>v</sup>/Kg/dia) apresentavam respostas terapêuticas similares aos que utilizavam doses altas (20mg/Sb<sup>v</sup>/Kg/dia). O esquema de baixas doses foi instituído visando diminuir os efeitos adversos observados quando doses altas eram administradas (Oliveira-Neto *et al.* 1996; Oliveira-Neto *et al.* 1997a; 1997b; Schubach *et al.* 2005).

Falhas relacionadas ao tratamento vêm sendo relatadas em diferentes áreas endêmicas (Azeredo-Coutinho *et al.* 2007; Rijal *et al.* 2007). Alguns autores admitem que este fato possa estar associado a fatores imunológicos do hospedeiro, fatores farmacológicos como absorção e perfusão do fármaco nos sítios de infecção e, principalmente fatores associados à resistência dos parasitos ao antimônio (Berman *et al.* 1982; Grogl *et al.* 1992; Croft *et al.* 2005; Croft *et al.* 2006). Entretanto, as verdadeiras razões para o desenvolvimento de resistência parasitária ou ocorrência de

falhas terapêuticas ainda permanecem pouco esclarecidas (Berman *et al.* 1982; Marsden 1985; Berman 1988; Grogl *et al.* 1991; Ponte-Sucre 2003).

O desenvolvimento da resistência, principalmente aos antimoniais é um fato que vem sendo nos últimos anos muito debatido (Sundar *et al.* 2000; Guerin *et al.* 2002; Misha *et al.* 2007) pelo potencial impacto nas leishmanioses já que o arsenal de drogas para o tratamento é limitado (Berman, 2003; Mishra *et al.* 2007; Santos *et al.* 2008).

A sensibilidade aos antimoniais *in vitro* de amostras isoladas de pacientes respondedores e não respondedores aos antimoniais tem sido avaliada objetivando correlacionar os resultados *in vitro* a resposta terapêutica *in vivo* (Jackson *et al.* 1990; Moreira *et al.* 1998; Azeredo-Coutinho *et al.* 2007; Rijal *et al.* 2007), ou ainda para verificar resistência parasitária a fármacos.

Neste estudo, comparamos a sensibilidade *in vitro* ao antimoniato de meglumina em pares de amostras de *Leishmania (V.) braziliensis*, isoladas dos mesmos pacientes, antes e após a falha terapêutica ou, reativação da LTA após tratamento inicial bem sucedido.

## **Materiais e Métodos**

### **Pacientes e amostras**

Consideraram-se elegíveis para o estudo pacientes com leishmaniose cutânea submetidos ao tratamento pelo antimonial pentavalente (Glucantime®) que apresentaram insucesso terapêutico ou reativação das lesões, e que possuíam duas amostras de *Leishmania* sp. isoladas da mesma lesão em momentos distintos. Identificou-se como amostra A, o isolado obtido no momento do diagnóstico e antes da introdução da terapêutica e como amostra B o isolado obtido após o insucesso terapêutico ou reativação das lesões. Foram consideradas para o estudo, somente amostras aos pares (A e B) de *Leishmania (V.) braziliensis* previamente identificados por eletroforese de isoenzimas, obtidas do mesmo paciente.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC-FIOCRUZ (número 0016.0.009-02). Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento antes da avaliação clínica e obtenção de material das lesões para cultura de *Leishmania*.

As amostras foram obtidas durante protocolo laboratorial para investigação diagnóstica por inoculação de fragmentos de lesões cutâneas em meio bifásico NNN (Novy, Nicolle and McNeal) e Schneider's Drosophila Médium (Sigma) enriquecido com 10% soro fetal bovino (SFB - Cultilab) e antibióticos associados. Os frascos de meio contendo os fragmentos foram incubados a temperatura de 26° a 28°C e monitorados semanalmente para o crescimento de promastigotas, durante 30 dias. Culturas positivas foram mantidas nas mesmas condições e criopreservadas em nitrogênio líquido. Em todos os ensaios, foram utilizados parasitos infectivos e em fase log e estacionária, estabelecida após a curva de crescimento.

### **Fármaco**

Utilizou-se antimoniato de meglumina (Glucantime®-Sb<sup>V</sup>, Aventis) disponível em ampolas de 5mL, contendo 81mgSb<sup>V</sup>/mL. O medicamento foi estocado a temperatura ambiente e utilizado diluído em meio de cultura Schneider (Sigma) ou RPMI-1640 (Gibco), sendo empregado em todos os ensaios o mesmo lote de Glucantime (Lote 604898).

### **Avaliação da sensibilidade ao antimonial pentavalente *in vitro***

A sensibilidade ao antimonial pentavalente foi avaliada em formas promastigotas e amastigotas das amostras pareadas (amostras A e B).

### **Formas promastigotas**

Os ensaios foram realizados em placas para cultura de 96 poços e avaliados após 24 e 48 horas de exposição ao antimoniato de meglumina. As amostras A e B foram avaliadas na mesma placa e no mesmo momento. Um volume de 100 uL da suspensão parasitos na concentração de  $1 \times 10^6$ , diluídos em meio Schneider, foram colocados nos poços da placa, em triplicatas, contendo o mesmo volume da droga (100uL). Foram empregadas diluições seriadas de antimoniato de meglumina, iniciando na concentração de 8,1mg/mL até 3,955ug/mL de Sb<sup>V</sup>. As placas foram incubadas em estufa biológica (26-28°C), e após 24 e 48 horas, os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer empregando corante vital (Azul de Trypan 0,1% em PBS).

Parasitas das amostras A e B, sem adição de antimoniato de meglumina foram utilizados como respectivos controles. Os valores obtidos a partir da contagem, em triplicatas, foram expressos em média e desvio padrão e comparados com os controles. Os dados obtidos das quantificações foram incluídos em gráficos usando o Microsoft Excel. A IC<sub>50</sub> foi determinada a partir da concentração da droga capaz de inibir 50% do crescimento parasitário (Machado *et al.* 2007).

### **Formas amastigotas**

Os ensaios de sensibilidade com formas amastigotas foram realizados a partir da infecção de macrófagos murinos *in vitro*, cujo protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA-FIOCRUZ, n° P0020-00).

Os macrófagos foram obtidos por esquemas de lavagens da cavidade peritoneal de camundongos adultos Swiss Webster, utilizando meio de cultura RPMI-1640 (Gibco) e infectados, separadamente com as amostras A e B. Os macrófagos foram plaqueados ( $2 \times 10^6$  macrófagos/mL) em lâmina para cultura de células (Lab-Tec®, Nalge Nunc International) e mantidos a 37°C em ambiente de CO<sub>2</sub> (5%). Após 24 horas, formas promastigotas de fase estacionária foram adicionadas na proporção de 5-10 parasitos/macrófago. Após duas horas, os parasitos não interiorizados foram retirados e o meio renovado. O antimoniato de meglumina foi incorporado após 24 horas da infecção nas concentrações de 20, 40 e 80µg Sb<sup>V</sup>/mL, diluído em meio RPMI-1640 (Gibco) e a cinética de infecção foi avaliada nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Em cada intervalo as lâminas foram lavadas com PBS pH 7,2 (37°C), fixadas com álcool metílico e coradas pelo Giemsa. Os controles consistiram de macrófagos infectados com as amostras A e B, respectivamente, sem exposição à droga. O efeito das diferentes concentrações do fármaco foi avaliado através da quantificação aleatória, em duplicatas, de 100 células, considerando o percentual de células infectadas e o número médio de amastigotas por célula. O índice de infecção foi obtido a partir desses parâmetros, sendo a IC<sub>50</sub> calculada a partir de um gráfico tipo dose resposta utilizando-se o GraphPad Prism (version 5.04), sendo expressa no ponto de 48 horas da cinética de infecção. Foram analisadas as proporções nos valores das IC<sub>50</sub> entre as amostras A e B.

## Resultados

Sete pares de amostras (A e B) foram obtidos de pacientes com LTA no Estado do Rio de Janeiro. Destes, 4 eram do sexo feminino e 3 do sexo masculino com idades que variaram de 18 a 71 anos. Cinco pacientes apresentaram de uma a duas lesões cutâneas, um paciente (nº 3) possuía 5 lesões e um apresentou leishmaniose cutânea disseminada (nº 2). Todos os pacientes foram tratados com Glucantime dos quais cinco foram submetidos ao esquema seriado com baixas doses (5mg/Sb<sup>v</sup>/Kg/dia) e dois pacientes com esquema intralesional (nºs 2 e 7). Insucesso terapêutico foi definido nos casos onde após o término do tratamento não se obteve a cicatrização completa da lesão e foi observado em 4 pacientes (nºs 1, 3, 4, e 5). Reativação foi considerada nos casos onde apesar de completa cicatrização, houve reativação da lesão primária após o tratamento inicial bem sucedido e foi observada em 2 (nºs 6 e 7) dos sete casos estudados.

O período de evolução da doença até o primeiro isolamento (obtenção da amostra A) variou de 1,5 a 18 meses, sendo tal período, em um caso (nº 6), ignorado. O intervalo entre isolamento da amostra A e amostra B variou de 7 (nº 4) a 27 (nº 6) meses. Estas informações e dados acerca do desfecho dos tratamentos empregados nos sete pacientes são apresentados na tabela 1.

Nos ensaios com formas promastigotas, a IC<sub>50</sub> variou de 0,3 a 5,8mg/Sb<sup>v</sup>/mL para as amostras A e de 0,8 a 7,8 mg/Sb<sup>v</sup>/mL para B e de 0,3 a 5,7 mg/Sb<sup>v</sup>/mL para as amostras A e de 0,7 a 7,6 mg/Sb<sup>v</sup>/mL para B, respectivamente em 24 e 48 horas de exposição. De um modo geral, a IC<sub>50</sub> obtida para as amostras B apresentou valores mais elevados em relação as amostras A, em ambos os pontos de 24 e 48 horas de exposição, com exceção para as amostras do paciente nº 2, onde a amostra B apresentou maior sensibilidade *in vitro*. As concentrações de Sb<sup>v</sup>, expressas em IC<sub>50</sub> (µg/mL) para as amostras A e B, para a forma promastigota estão apresentados na tabela 2. Nas figuras 1 e 2 são apresentados os gráficos relacionados à curva do percentual de inibição, respectivamente em 24 e 48 horas de exposição, onde a IC<sub>50</sub> obtida para cada amostra é indicada através do ponto de interseção da curva com o valor que indica 50% de inibição (eixo Y) com a respectiva concentração de antimoniato de meglumina (eixo X).

Com relação à sensibilidade de formas amastigotas intracelulares ao Sb<sup>v</sup>, observamos que no ponto de 72 horas, todas as concentrações empregadas (20, 40 e

80 $\mu$ g/mL) produziram uma redução drástica do percentual de células infectadas e do n° médio de amastigotas intracelulares para a maioria das amostras estudadas. Por essa razão, consideramos o ponto de 48 horas para o cálculo da IC<sub>50</sub>.

Nas formas amastigotas, os valores da IC<sub>50</sub> variaram de 11,7 a 44,3 $\mu$ g/mL para as amostras A e de 13,7 a 52,7 $\mu$ g/Sb<sup>v</sup>/mL para as amostras B. Analisando as proporções entre A e B, observamos que os valores da IC<sub>50</sub> das amostras B foram superiores a A, em quatro dos sete pacientes avaliados. Nas amostras dos pacientes (2, 3 e 5) ocorreu aumento de 17 a 20% na IC<sub>50</sub> das amostras B em relação a A e no paciente 6 este aumento foi de 100% em relação a amostra A. Essas diferenças foram menores para os demais pacientes estudados. Os gráficos da curva dose-resposta das sete amostras pareadas (A e B) são apresentados na figura 3. A IC<sub>50</sub> é indicada através do ponto de interseção da curva (considerando 50% do eixo Y) com o valor, em  $\mu$ g/mL, de antimoniato de meglumina (eixo X).

## Discussão

Os antimoniais pentavalentes são utilizados no tratamento das leishmanioses há cerca de seis décadas com eficácia variável. O fenômeno da resistência parasitária conhecido em outras doenças, vem sendo descrito nas leishmanioses (Sundar *et al.* 2000; Guerin *et al.* 2002; Misha *et al.* 2007). Diversas especulações têm sido feitas, no entanto, não existe ainda, um marcador molecular que possa determinar com segurança a resistência dos parasitos do gênero *Leishmania* aos antimoniais pentavalentes (Chakravarty and Sundar 2010).

Os pacientes selecionados para o estudo foram diagnosticados, tratados e acompanhados no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ/RJ) onde há vários anos utiliza-se a dose de 5mg/Sb<sup>v</sup>/Kg/dia, com base em estudos que vêm sugerindo que pacientes submetidos a doses altas (20mg/Sb<sup>v</sup>/Kg/dia) ou baixas (5mg/Sb<sup>v</sup>/Kg/dia) apresentam respostas terapêuticas similares (Oliveira-Neto *et al.* 1997a; 1997b; Schubach *et al.* 2005). Dos sete pacientes incluídos neste estudo, 5 receberam doses baixas de antimônio (5mg/Sb<sup>v</sup>/Kg) em série. Destes, 4 apresentaram falha terapêutica, não sendo obtido cicatrização completa da lesão após o término do tratamento e 3 apresentaram reativação da lesão em período que variou de 13 a 27 meses. Embora tal esquema terapêutico seja empregado com sucesso no IPEC, os casos

selecionados para este estudo visaram justamente os que possuíam amostras isoladas, antes e após falha terapêutica ou reativação.

Variáveis como idade, esquema terapêutico, forma clínica, nº de lesões, tempo de evolução da doença, presença de co-morbidades estão entre as variáveis que podem influenciar a resposta ao tratamento (Rodrigues *et al.* 2006). Embora o grupo estudado tenha sido pequeno (sete pacientes) tais variáveis foram muito diversificadas, não sendo possível estabelecer qualquer correlação com a resposta ao tratamento com antimônio pentavalente.

Outra variável que pode também interferir na evolução clínica e na resposta ao tratamento é a espécie do parasito envolvido ou o polimorfismo genético de subpopulações. Sabe-se que *L. braziliensis* é composta por populações que apresentam elevada variabilidade genética e causam, predominantemente, lesões cutâneas e mucosas. No entanto, no estado do Rio de Janeiro, apesar de diferentes padrões clínicos, bem como variadas resposta ao tratamento serem relatados, o perfil genético de *L. braziliensis* é considerado mais homogêneo (Baptista *et al.* 2009).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que *L. braziliensis* apresenta maior sensibilidade aos antimoniais quando comparados com outras espécies de *Leishmania* (Azeredo-Coutinho *et al.* 2007). De outro lado, a taxa de cura em pacientes infectados por *L. braziliensis* também é maior do que em pacientes infectados por *L. mexicana* (Navian *et al.* 1992). No Peru, Arevalo *et al.* (1997) observaram uma forte associação da espécie de *Leishmania* na influência da resposta terapêutica dos pacientes. Esses fatos demonstram que a identificação etiológica pode ser uma importante informação e sugere porque no Rio de Janeiro a resposta aos antimoniais é tida como favorável (Schubach *et al.* 2005).

As hipóteses sobre o desenvolvimento de resistência parasitária aos antimoniais tiveram início nas publicações de Grogl *et al.* (1989) onde em ensaios *in vitro*, demonstraram a seleção de clones de parasitos resistentes, sugerindo que as falhas ao tratamento, relatadas em diferentes regiões, poderiam estar relacionadas aos esquemas terapêuticos empregados. Essa observação foi fortalecida a partir dos relatos de Sundar *et al.* (1994), na Índia, onde houve um descontrole no uso dos antimoniais no tratamento da leishmaniose visceral. No entanto, muitas vezes fica difícil associar falha terapêutica somente à resistência parasitária, onde inúmeros fatores estão envolvidos. (Jackson *et*

*al.* 1990; Moreira *et al.* 1998; Rijal *et al.* 2007). O conhecimento de algumas características dos parasitos isolados, em diferentes situações, pode trazer elementos importantes nessa discussão.

Neste estudo, avaliamos, de forma pareada, 14 amostras de *Leishmania braziliensis* isoladas antes e após a terapêutica, com relação à sensibilidade *in vitro* ao antimonial pentavalente, sob as formas promastigotas e amastigotas.

A limitação da utilização de formas promastigotas, nesses ensaios deve-se ao fato de não ser a forma evolutiva do hospedeiro vertebrado. Sabe-se que formas promastigotas são menos sensíveis à ação do glucantime, necessitando de doses mais elevadas que amastigotas (Azeredo-Coutinho *et al.* 2007). Vermeersch *et al.* (2009) sugerem que o modelo com amastigotas intracelulares deve ser utilizado como padrão ouro na avaliação da sensibilidade *in vitro*.

Com formas promastigotas verificamos que todas as amostras B apresentaram valores da IC<sub>50</sub> superiores quando comparadas com as amostras A, exceto para um paciente. Esse resultado sugeriu que amostras isoladas após o insucesso terapêutico ou reativação poderiam ser mais resistentes ao Glucantime® *in vitro*, embora nossos resultados tenham apresentado grande heterogeneidade com relação aos valores obtidos das IC<sub>50</sub> que variaram de 0,3 a 5,8 mg/mL para as amostras A e de 1,7 a 7,8 mg/mL para as amostras B. No entanto, estes resultados estão de acordo com outros estudos, que revelaram valores da IC<sub>50</sub> entre 0,8 a 9,5 mg/mL (Azeredo-Coutinho *et al.* 2007) e de 0,2 a 8,8 mg/mL (Callahan *et al.* 1997) quando formas promastigotas foram utilizadas. Da mesma forma, nos ensaios com amastigotas intracelulares observamos variações nos valores da IC<sub>50</sub> entre A e B. De uma forma geral as amostras B apresentaram IC<sub>50</sub> superior a A, com aumentos que variaram de 100 em um paciente, e de 17-20% em três dos sete pacientes avaliados. Estes resultados sugerem que amostras obtidas após o insucesso terapêutico ou reativação destes quatro pacientes podem ser mais resistentes ao antimônio pentavalente em ensaios *in vitro*. Nos demais isolados as diferenças entre a sensibilidade das amostras A e B foram menos expressivas. No entanto, neste estudo não foi possível estabelecer relação entre a resposta terapêutica e os dados de sensibilidade obtidos *in vitro*, visto que dos quatro pacientes que apresentaram aumento da IC<sub>50</sub> nas amostras B, dois pacientes evoluíram para cicatrização após retratamento

com antimonial. Zauli-Nascimento *et al.* (2010) também não observaram correlações entre os resultados *in vitro* com a resposta terapêutica em pacientes com LTA.

Sob as condições do nosso estudo, formas promastigota e amastigota (A e B) foram sensíveis ao glucantime, no entanto não houve correlação dos resultados de sensibilidade *in vitro* entre ambas as formas em quatro dos sete pacientes estudados. De acordo com Azeredo-Coutinho *et al.* (2007), foram obtidas boas correlações entre a sensibilidade apresentada nas formas amastigotas e promastigotas de um mesmo isolado.

A susceptibilidade a drogas *in vitro*, tanto de formas promastigotas quanto em amastigotas é variável, e pode estar relacionada às condições experimentais utilizadas ou mesmo, características inerentes das formas evolutivas. Adicionalmente, correlações de resultados obtidos nos ensaios *in vitro* com a resposta ao tratamento é por vezes inconsistente nos vários relatos da literatura (Berman *et al.* 1980; Grogl *et al.* 1992; Robledo *et al.* 1999), demonstrando que são inúmeras as variáveis que podem ter influencia positiva ou negativa sobre os resultados, devendo as correlações serem tratadas com certa cautela.

De acordo com Zauli-Nascimento *et al.* (2010) não existem evidências, no Brasil, de resistência parasitária primária como a relatada em outras áreas endêmicas. Pelo fato da resposta ao tratamento ser multifatorial, inúmeras abordagens devem ser consideradas e estudos que empregam amostras pareadas devem ser incentivados. 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 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.

### **Agradecimentos**

Este trabalho recebeu suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

## Referências

- Arevalo J, Ramirez L, Aduai V *et al* (2007) Influence of *Leishmania* (Viannia) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *Journal Infectious Disease* **195**, 1846-1851.
- Azeredo-Coutinho RB, Mendonça SC, Callahan H *et al.* (2007) 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. *Journal of Parasitology* **93**, 688-693.
- Baptista C, Schubach AO, Madeira MF *et al.* (2009) *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Experimental Parasitology* **121**, 317-22.
- Berman JD & Wyler DJ (1980) An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. *Journal Infectious Disease* **142**, 83-86.
- Berman JD, Chulay JD, Hendricks LD *et al.* (1982) Susceptibility of clinically sensitive and resistant *Leishmania* to pentavalent antimony in vitro. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* **31**, 459-465.
- Berman JD (1988) Chemotherapy for leishmaniasis: Biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. *Reviews of Infectious Diseases* **10**: 560-586.
- Berman J.D (2003) Current treatment approaches to leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases* **16**, 397-401.
- Callahan HL, Portal AC, Devereaux R *et al.* (1997) An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 818-822.
- Chakravarty J & Sundar S (2010) Drug resistance in leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases* **2**, 167-176.
- Croft SL, Barrett MP & Urbina JA (2005) Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitology* **21**, 508–512.
- Croft SL, Seifert K & Yardley V (2006) Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research* **123**, 399–410.

- Grögl M, Ayoade MJ, Cordero LDC *et al.* (1989) Leishmania ssp.: Development of pentostam-resistant clones in vitro by discontinuous drug exposure. *Experimental Parasitology* **69**, 78-90.
- Grögl M, Martin RK, Ayoade MJ *et al.* (1991) Characteristics of multidrug resistance in Plasmodium and Leishmania: detection of p-glycoprotein-like components. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* **45**, 98-111.
- Grögl M, Thomason T & Franke ED (1992) Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* **47**, 117-126.
- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S *et al.* (2002) Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases* **2**, 494-501.
- Jackson JE, Tally JD, Ellis WY *et al.* (1990) Quantitative in vitro drug potency and drug susceptibility evaluation of Leishmania ssp. from patients unresponsive to pentavalent antimony therapy. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* **43**, 464-480.
- Marsden PD (1985) Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **18**, 187-198.
- Marzochi MC (1992) A Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **63**, 82-104.
- Marzochi MC & Marzochi KBF (1994). Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública* **10**, 359-375.
- Mishra J, Saxena A & Singh S (2007) Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Current Medicine Chemistry* **14**, 1153-1169.
- Moreira ES, Anacleto C & Petrillo-Peixoto ML (1998) Effect of glucantime on field and patient isolates of New World Leishmania: use of growth parameters of promastigotes to assess antimony susceptibility. *Parasitology Research* **84**, 720-726.
- Machado GM, Leon LL & De Castro SL (2007) Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of Leishmania. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **102**, 73-77.

- Navin TR, Arana BA, Arana FE, Berman JD, Chajon JF. 1992. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J Infect Dis.* **165**, 528-34.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Araujo ML et al. (1996) High and low doses of antimony (Sbv) in American cutaneous leishmaniasis. A five years follow-up study of 15 patients. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **91**, 207-209.
- Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA et al. (2000) American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *International Journal Dermatology* **39**, 506-514.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M et al. (1997<sup>a</sup>) A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* **57**, 651–655.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M (1997<sup>b</sup>) Treatment of American cutaneous leishmaniasis: a comparison between low dosage (5 mg/kg/day) and high dosage (20 mg/kg/day) antimony regimens. *Pathologie Biologie* **45**, 496-499.
- Shaw JJ (2003) New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: Farrell, J. (Ed.), *World Class Parasites: Leishmania*. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 11–31.
- Ponte-Sucre A (2003) Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biology Disease* **28**, 5-14.
- Rijal S, Yardley V, Chappuis F et al. (2007) Antimonial treatment of visceral leishmaniasis: are current in vitro susceptibility assays adequate for prognosis of in vivo therapy outcome. *Microbes and Infection* **9**, 529-535.
- Robledo SM, Valencia AZ, Saravia NG (1999) Sensitivity to Glucantime of *Leishmania viannia* isolated from patients prior to treatment. *Journal of Parasitology* **85**, 360-366.
- Rodrigues AM, Hueb M, Santos TA et al. (2006) Factors associated with treatment failure of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **39**, 139-145.

- Schubach A, Marzochi KB, Moreira JS *et al.* (2005) Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **38**, 213-217.
- Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF *et al.* (2008) Leishmaniasis treatment a challenge that remains: a review. *Parasitology Research* **103**, 1-10.
- Sundar S, More DK, Singh MK *et al.* (2000) Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clinical Infectious Diseases* **31**, 1104–1106.
- Sundar S, Thakur BB, Tandon AK *et al.* (1994) Clinicoepidemiological study of drug resistance in Indian kala-azar. *British Medical Journal* **29**, 307.
- Vermeersch M, da Luz RI, Toté K *et al.* (2009) In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 3855-9.
- W.H.O. World Health Organization Control of Leishmaniases (2008) Technical Report Series p.793.
- Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK *et al.* (2010) In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Tropical Medicine and International Health* **15**, 68-76.

**Tabela 1** Dados dos sete pacientes incluídos neste estudo, cujas amostras de *L. (V.) braziliensis* foram obtidas e analisadas nos ensaios *in vitro*.

<b>Código do paciente</b>	<b>Evolução até o diagnóstico*</b>	<b>Intervalo entre a obtenção da amostra A e B*</b>	<b>Fármaco utilizado no retratamento</b>
1	18	21	Anfotericina B
2	3	13	Anfotericina B
3	1,5	14	Glucantime
4	2	07	Abandono
5	1,5	18	Anfotericina B
6	Ignorado	27	Glucantime
7	1,5	13	Anfotericina B

\*(intervalo em meses);

**Tabela 2:** Valores da IC<sub>50</sub> (mg/Sb<sup>v</sup>/mL) para formas promastigotas das amostras A e B de *Leishmania (Viannia) braziliensis* avaliadas nos intervalos de 24 e 48 horas de exposição à diferentes concentrações de antimoniato de meglumina.

<b>Paciente</b>	<b>Amostra A</b>		<b>Amostra B</b>	
	<b>IC<sub>50</sub> (mg/mL)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/mL)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/mL)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/mL)</b>
	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
1	3,06 ± 0,34	1,08 ± 0,14	6,98 ± 0,17	5,82 ± 0,30
2	4,38 ± 0,45	5,75 ± 0,26	0,89 ± 0,04	1,37 ± 0,11
3	0,37 ± 0,10	0,37 ± 0,09	1,78 ± 0,08	0,70 ± 0,02
4	5,20 ± 0,04	3,04 ± 0,06	6,79 ± 0,12	5,35 ± 0,48
5	5,86 ± 0,29	3,28 ± 0,05	7,80 ± 0,15	7,68 ± 0,05
6	4,53 ± 0,34	3,00 ± 0,04	7,46 ± 0,08	5,61 ± 0,09
7	5,05 ± 0,18	1,04 ± 0,06	7,70 ± 0,04	3,56 ± 0,17

**Tabela 3:** Valores da IC<sub>50</sub> (µg/Sb<sup>v</sup>/mL) para formas amastigotas intracelulares obtidos no ponto de 48 horas de exposição ao antimoniato de meglumina, para cada uma das amostras avaliadas (A e B) dos sete pacientes incluídos no estudo

Nº do paciente	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
	<b>A</b>	<b>B</b>
1	17,97	17,94
2	11,7	13,7
3	11,7	14,1
4	14,0	15,2
5	44,3	52,7
6	16,1	33,7
7	16,8	16,3

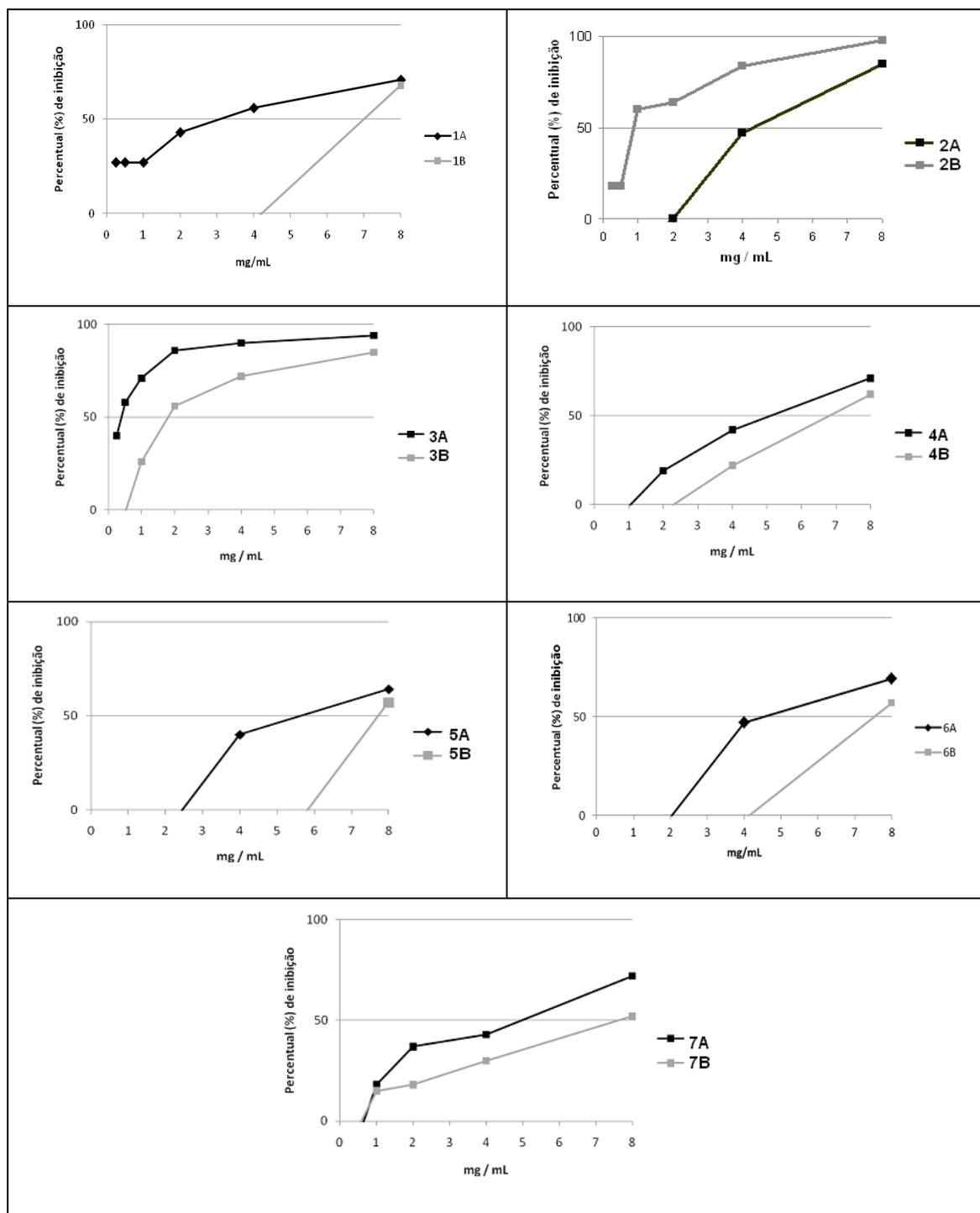


Figura 1: Identificação gráfica do percentual de inibição de formas promastigotas obtidas com as amostras A e B dos 7 pacientes estudados expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina por 24 horas. A identificação do paciente é dado pela legenda do gráfico.

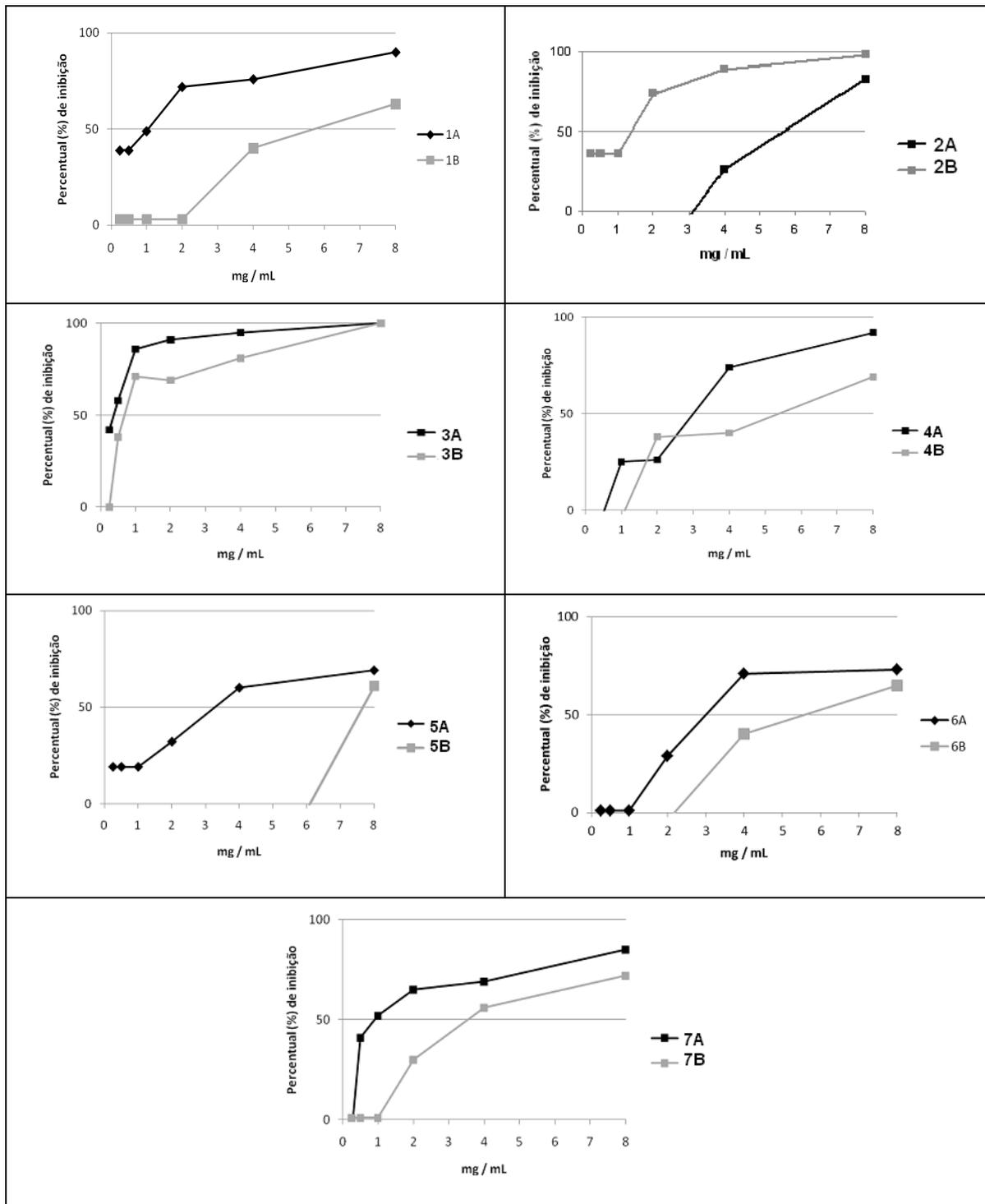


Figura 2: Identificação gráfica do percentual de inibição de formas promastigotas obtidas com as amostras A e B dos 7 pacientes estudados expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina por 48 horas. A identificação do paciente é dado pela legenda do gráfico.

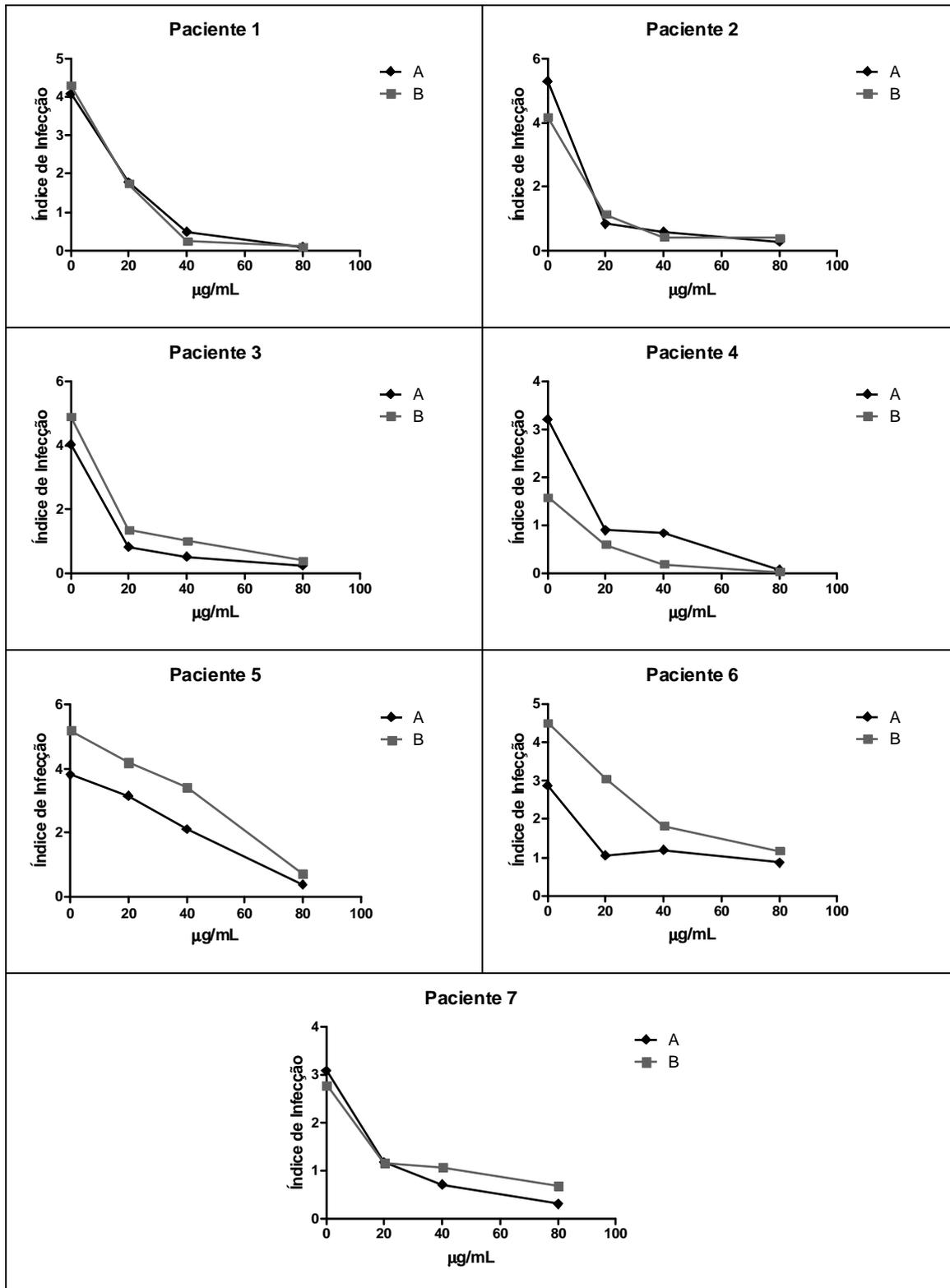


Figura 3: Gráficos das curvas dose-resposta obtidas para as amostras A e B, nos ensaios com formas amastigotas. O índice de infecção considerou o percentual de células infectadas e o número médio de amastigotas intracelulares no ponto de 48 horas.

#### 4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A LTA é uma doença de grande complexidade e importância em saúde pública, não apenas por apresentar um ciclo de transmissão envolvendo diferentes espécies de parasitos, vetores, e hospedeiros, mas também por apresentar diferentes manifestações clínicas entre seus hospedeiros, desde a ocorrência de formas típicas da doença até manifestações menos freqüentes ou algumas vezes mais graves e de difícil tratamento.

As manifestações clínicas da doença e a resposta ao tratamento estão parcialmente relacionadas à espécie de *Leishmania* envolvida (ALEXANDER & RUSSEL, 1992; GROGL et al, 1992; NAVIN et al, 1992; LAISON & SHAW 1987). No estado do Rio de Janeiro, *Leishmania (V.) braziliensis* é a principal espécie envolvida nos casos de LTA, cuja apresentação clínica mais frequente é a úlcera cutânea única. No entanto, alguns casos atípicos de LTA têm sido descritos. Neste estado a presença de reativação clínica pode ocorrer durante o tratamento das leishmanioses em 16% de casos (OLIVEIRA-NETO et al, 1997; SCHUBACH et al, 2005).

A identificação dos parasitos em determinada área endêmica é importante para o monitoramento das espécies circulantes. A eletroforese de multilocos enzimáticos (MLEE) é amplamente utilizada para caracterização taxonômica de espécies de *Leishmania* (MOMEN et al, 1985; CUPOLILLO et al, 1994). Embora a técnica de isoenzimas seja uma ferramenta amplamente empregada na caracterização de parasitos do gênero *Leishmania*, constitui um marcador pouco polimórfico. Todas as amostras analisadas neste estudo (64 amostras) foram caracterizadas pela técnica como *L.(V.)*

*braziliensis* e nenhuma variante enzimática foi detectada. Entretanto em outras regiões do Brasil variabilidade em amostras de *L.(V.) braziliensis* tem sido demonstrada através da técnica de MLEE. CUPOLILLO et al (2003) sugerem que apenas um zimodema (Z 27) de *L. (V.) braziliensis* esteja envolvido na doença humana e animal no estado do Rio de Janeiro e que as cepas apresentam nesta área endêmica menor variabilidade do que em outras regiões do Brasil.

Além de MLEE, outras técnicas podem ser melhor aplicadas em estudos de diversidade genética em tripanosomatídeos, se destacando entre estas a análise do perfil de restrição do kDNA (esquizodemas) e a análise do polimorfismo de DNA amplificado ao acaso - RAPD (HANAFI et al 2001; ISHIKAWA et al, 2002; MARTINEZ et al, 2003; PACHECO et al, 2005), reação em cadeia da polimerase de baixa estringência - LSSP-PCR (FERREIRA et al, 2007) entre outras. Marcadores genéticos são capazes de distinguir as diferentes espécies ou revelar polimorfismo intraespecífico. Muitos marcadores são empregados com o objetivo maior de identificar se existe associação genética entre os isolados de *Leishmania* sp. e as diferentes formas clínicas ou evolução da doença e, as técnicas de RAPD e LSSP-PCR têm demonstrado boa reprodutibilidade neste contexto (FERREIRA et al, 2007; de OLIVEIRA et al, 2010).

De acordo com LAURENT et al (2007), diferentes subpopulações de parasitos podem estar envolvidas no ciclo de transmissão das leishmanioses e a emergência de populações mais resistentes ou capazes de causar manifestações clínicas atípicas devem ser detectadas na tentativa de conter esses casos eventuais.

O primeiro artigo publicado que compõe esta tese descreve a utilização de dois marcadores moleculares (RAPD e LSSP-PCR) em um grupo de amostras de *L braziliensis* provenientes de pacientes com evolução clínica típica e atípica da LTA.

Observamos um perfil de baixa complexidade genética entre as amostras provenientes do estado do Rio de Janeiro a partir da detecção de um genótipo prevalente. Este resultado corrobora dados anteriores (CUPOLILLO et al, 2003) que descrevem maior homogeneidade para esta área endêmica. No entanto, este mesmo genótipo prevalente foi detectado em sete amostras obtidas a partir das lesões de pacientes que apresentaram reativação clínica após um primeiro tratamento bem sucedido com antimoniato de meglumina. Entre os 9 genótipos de *L. (V.) braziliensis* detectados neste estudo, nenhuma associação pode ser observada entre um determinado genótipo e evoluções clínicas típicas ou atípicas da LTA. No estado da Bahia, alguns genótipos detectados por RAPD puderam ser associados com a forma mucosa e disseminada da LTA (SCHRIEFER et al, 2004). Aspectos clínicos e polimorfismo genético em *L. infantum* também puderam ser correlacionados (GUERBOUJ et al, 2001). No entanto outros autores, corroborando nossos achados, não conseguiram tal associação (CUERVO et al, 2004; GARCIA et al, 2005; de OLIVEIRA et al, 2010).

BANULS et al (2007) atentam para o fato de que muitos marcadores moleculares utilizados não são capazes de associar polimorfismo intraespecífico e dados clínicos, ou fazem fracas associações que não esclarecem o papel desempenhado pelo parasito no resultado da doença, nem permite o uso destas ferramentas como marcadores de prognóstico. Neste contexto, é importante mencionar que uma grande variabilidade de respostas é encontrada no tratamento das leishmanioses, dificultando o prognóstico da doença. O antimônio pentavalente é eficaz na maioria dos casos, no entanto, a falha terapêutica tem sido descrita e pode estar aumentando em intensidade e prevalência em determinadas regiões endêmicas (BERMAN 1988; GROGL et al, 1992; UNGER et al, 2009). Entre os anos de 1989 e 2010 foram detectados no Laboratório de

Vigilância em Leishmanioses - VigiLeish-IPEC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro - Brasil 15% de casos de falha terapêutica e/ou reativação de lesões, diferentemente do que se observa em algumas regiões do país onde o insucesso terapêutico chega a 29% nos pacientes com LTA tratados com antimonial pentavalente (TUON et al, 2008). No estado do Rio de Janeiro, o tratamento com baixa dose ou utilizando esquemas alternativos de administração do antimônio pentavalente, apresenta bons resultados principalmente ligados a diminuição de efeitos adversos (SCHUBACH et al, 2005, OLIVEIRA-NETO et al, 2006, VASCONCELLOS et al 2010).

Um interessante resultado obtido pelo nosso grupo foi a detecção de diferenças no genótipo de isolados obtidos da lesão inicial e após reativação em um mesmo paciente (BAPTISTA et al, 2009). Este dado incentivou a realização de um segundo manuscrito que ao nosso conhecimento é o primeiro relato da avaliação do polimorfismo genético entre isolados pareados provenientes de dois momentos específicos: antes do tratamento (amostras A) e após o falha terapêutica ou reativação de lesões cutâneas (amostras B). Neste estudo os resultados demonstraram que apenas dois pares de amostras (A e B) apresentaram total identidade. Esses pares de isolados foram provenientes de pacientes que apresentaram falha terapêutica, com tempo de 7 (paciente 3) e 14 meses (paciente 2) entre a obtenção do primeiro e segundo isolamento. Os outros dois pacientes que apresentaram falha terapêutica apresentaram tempo entre o primeiro e o segundo isolamento de 18 (paciente 7) e 21 meses (paciente 4). Isto sugere que o tempo decorrido durante o processo de falha terapêutica possa ter influência sobre os perfis genéticos mais polimórficos. Os isolados provenientes de pacientes com reativação após sucesso terapêutico inicial foram agrupados em quatro clusters com maior ou menor similaridade entre os pares de amostras A e B.

Nenhuma correlação entre perfil genotípico e dados clínicos dos pacientes foi identificada, sugerindo que o polimorfismo existente entre os pares de isolados provenientes de um mesmo paciente pode estar relacionado à emergência de subpopulações *in vivo* a partir de um inóculo policlonal (Pacheco et al, 1995) ou ainda da seleção pela exposição ao tratamento.

É importante destacar os conceitos de reativação e falha terapêutica, que segundo Bryceson (2001) são ocasionadas por mecanismos diferentes. A falha terapêutica poderia ser um indício de resistência parasitária. Já a reativação da leishmaniose pode estar relacionada ao estado imunológico do paciente (Saravia et al., 1990), a forma clínica da doença e também a fatores de virulência do parasito. Em pacientes de áreas endêmicas, a distinção entre a reativação e re-infecção nem sempre é uma tarefa fácil (Saravia et al., 1990), fato que sugere a necessidade de rastreamento genético e identificação de subpopulações circulantes na área.

Apesar da efetividade dos antimoniais, acredita-se que os riscos de reativações e o desenvolvimento de lesões mucosas ou falha terapêutica estejam associados principalmente à esquemas incompletos ou administrados de forma inadequada (BRYCESON et al, 1985; RODRIGUES et al, 2006). Nesta tese é relatado o caso de um paciente que apresentou resistência ao antimônio pentavalente, cujo isolado obtido no momento do diagnóstico foi mais sensível *in vitro*, do que o isolado proveniente após a reativação da lesão, sugerindo que a exposição ao antimonial *in vivo* possa ter influenciado este resultado (PIMENTEL et al, 2011).

Para confirmar esta hipótese, outros 7 isolados pareados de *Leishmania (V.) braziliensis* foram avaliados empregando-se formas promastigotas e verificamos que a maioria das amostras obtidas após insucesso terapêutico ou reativação apresentaram

valores da  $IC_{50}$  superiores quando comparadas com as amostras antes do tratamento. Os ensaios com formas amastigotas destes mesmos isolados, de uma forma geral, apresentaram  $IC_{50}$  superior para as amostras B em relação a A, com aumentos que variaram de 100 em um paciente e de 17 a 20% em três dos sete paciente avaliados. Estes resultados sugerem que as amostras obtidas destes quatro pacientes após o insucesso terapêutico ou reativação podem ser mais resistentes ao antimônio pentavalente em ensaios *in vitro*. Sob as condições do nosso estudo, formas promastigota e amastigota (A e B) foram sensíveis ao glucantime, no entanto tais formas não apresentaram correlações nos resultados entre as amostras A e B em quatro dos sete pacientes estudados. De acordo com Azeredo-Coutinho et al (2007<sup>b</sup>), boa correlação entre resultados obtidos *in vitro* com formas amastigotas e promastigotas provenientes de um mesmo isolado foi observada.

O uso de formas promastigotas nos ensaios *in vitro* com antimônio pentavalente é muito questionado principalmente por não ser esta a forma parasitária presente no hospedeiro vertebrado, mas também porque a quantidade do fármaco necessária para inibir 50% dos parasitos é cerca de 600 vezes maior do que para formas amastigotas, ou ainda porque a efetividade do fármaco necessita do ambiente intracelular para sua ação (BERMAN et al, 1985; ROBERTS et al, 1995; WYLLIE et al, 2004; VERMEERSCH et al 2009). A susceptibilidade a drogas *in vitro*, comparando formas promastigotas e amastigotas é variável, o que pode estar correlacionada com as condições experimentais utilizadas ou mesmo, características inerentes das formas evolutivas. Nossos resultados demonstraram variabilidade nos valores de  $IC_{50}$  obtidas entre os isolados A e B, principalmente nos ensaios com formas promastigotas.

Neste estudo não foi possível estabelecer relação entre a resposta terapêutica e os dados de sensibilidade obtidos *in vitro*, visto que dos quatro pacientes que apresentaram aumento da  $IC_{50}$  nas amostras B, dois foram curados durante retratamento com antimonial pentavalente. Correlações de resultados obtidos nos ensaios *in vitro* com a resposta ao tratamento é por vezes inconsistente nos vários relatos da literatura (BERMAN *et al.* 1980; GROGL *et al.* 1992; ROBLEDO *et al.* 1999; RIJAL *et al.* 2007; ZAULI-NASCIMENTO *et al.* 2010), demonstrando que são inúmeras as variáveis que podem ter influência positiva ou negativa sobre os resultados. Neste contexto, tais correlações devem ser tratadas com cautela.

Todos os pacientes aqui avaliados na condição de insucesso terapêutico ou reativação apresentaram cura clínica após retratamento, com exceção de um caso de abandono. Cinco pacientes apresentaram cura clínica após administração da Anfotericina B ou Pentamidina. Os demais pacientes foram curados com o emprego do antimonial pentavalente em diferentes esquemas terapêuticos (uso contínuo, em série, ou administração intralesional).

É interessante ressaltar que as amostras A e B obtidas de um mesmo paciente sem maiores diferenças nos valores de  $IC_{50}$  demonstraram, por LSSP-PCR, índice de similaridade igual a 1, indicando que essas amostras são idênticas geneticamente. Outros dois pacientes na mesma condição clínica (falha terapêutica), apresentaram polimorfismo genético que pode estar associado ao tempo entre o primeiro e segundo isolamento. Já as amostras do paciente que apresentou um aumento de 100% na  $IC_{50}$  da amostra B em relação a A, também apresentou polimorfismo genético. Embora essas relações tenham sido identificadas, os resultados experimentais não puderam ser extrapolados para a resposta terapêutica *in vivo*.

De acordo com Zauli-Nascimento et al (2010), no Brasil não existem evidências de resistência parasitária primária como a relatada em outras áreas endêmicas. Possíveis propostas para a questão da variabilidade de respostas terapêuticas apresentadas ao tratamento com antimônio pentavalente podem estar ligadas à resistência inerente do parasito ao antimônio, assim como, a falhas do hospedeiro quanto à resposta imune, fisiologia e farmacocinética da droga. Alguns autores questionam a falha terapêutica ao antimonial como um fator ligado a resistência parasitária, sugerindo aspectos relacionados à resposta imune dos hospedeiros (YARDLEY et al, 2006). Desta forma, a capacidade que alguns indivíduos desenvolvem para controlar a infecção e replicação parasitária sem progressão da doença clínica aparente pode ser consequência de uma boa modulação da resposta imune (BITTAR et al, 2007).

Infelizmente ainda não se dispõe de um marcador para identificar resistência aos fármacos utilizados no tratamento ou prever a evolução ou o prognóstico da doença (ASHUTOSH et al, 2007). Todos os resultados apresentados neste estudo reforçam a complexidade dos parasitos do gênero *Leishmania* e a resposta produzida pelos seus hospedeiros demonstrando que várias abordagens devem ser consideradas. Dentro da complexa relação parasito-hospedeiro é possível que fatores tanto do parasito como do hospedeiro tenham papel semelhante.

## 5. CONCLUSÕES

- i. Todas as amostras analisadas foram identificadas como *L. (V.) braziliensis*, nenhuma variante enzimática foi detectada, reforçando que este é o principal agente etiológico da LTA no Rio de Janeiro;
- ii. Não foi encontrada associação entre variabilidade genética dos isolados de *L. (V.) braziliensis* e evoluções clínicas típicas e atípicas da LTA;
- iii. Polimorfismo genético foi detectado nos isolados provenientes de um mesmo paciente antes do tratamento e após insucesso terapêutico ou reativação da lesão cutânea, demonstrando que as subpopulações diferiram geneticamente nestes dois momentos;
- iv. Nos ensaios com formas promastigotas observou-se valores da IC<sub>50</sub> superiores na maioria das amostras obtidas após insucesso terapêutico ou reativação da lesão cutânea;
- v. Com amastigotas, os isolados obtidos após falha terapêutica ou reativação apresentaram valores da IC<sub>50</sub> superior aos isolados pretratamento apenas em quatro pacientes;
- vi. Não houve correlação dos resultados de sensibilidade *in vitro* entre formas promastigotas e amastigotas em quatro dos sete pacientes estudados;
- vii. Não foi possível correlacionar os resultados obtidos neste estudo com as diferentes manifestações clínicas ou de resposta ao tratamento com antimoniato de meglumina, reforçando a complexidade dos parasitos do

gênero *Leishmania* e a multiplicidade de formas clínicas e de respostas produzidas por seus hospedeiros.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander J, Russell DG. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv Parasitol.* 1992;31:75-254.

Amato V, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77(2):266-274.

Amato VS, Tuon FF, Imamura R, Abegão de Camargo R, Duarte MI, Neto VA. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009;23(9):1026-1034.

Arevalo J, Ramirez L, Aduai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, et al. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2007;195(12):1846-1851.

Ashutosh, Sundar S, Goyal N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol.* 2007;56(2):143-153.

Azeredo-Coutinho RB, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007<sup>a</sup> ;101(7):735-737.

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<sup>b</sup>;93(3):688-693.

Baiocco P, Colotti G, Franceschini S, Ilari A. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *J Med Chem.* 2009;52(8):2603-2012.

Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Adv. Parasitol.* 2007;64:1-113.

Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, et al. *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;121(4):317-322.

Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med.* 2004;4:601–609.

Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: Biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. *Rev Infect Dis.* 1988;10:560-586.

Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical Mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1985;27: 916-920.

Berman JD, Chulay JD, Hendricks LD, Oster CN. Susceptibility of clinically sensitive and resistant *Leishmania* to pentavalent antimony *in vitro*. *Am J Trop Med Hyg.* 1982;3:459-65.

Berman JD, Lee LS. Activity of oral drugs against *Leishmania tropica* in human macrophages *in vitro*. *Am J Trop Med Hyg.* 1983;32(5):947-951.

Berman JD, Wyler DJ. An *in vitro* model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1980;142(1):83-86.

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

Bryceson A. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Trop Med Int Health.* 2001;6(11):928-34.

Bryceson AD, Chulay JD, Ho M, Mugambii M, Were JB, Muigai R, et al. Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. I. Clinical and immunological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985;79(5):700-4.

Castillo E, Dea-Ayuela MA, Bolás-Fernández F, Rangel M, González-Rosende ME. The kinetoplastid chemotherapy revisited: current drugs, recent advances and future perspectives. *Curr Med Chem.* 2010;17(33):4027-4051.

Chakravarty J, Sundar S. Drug resistance in leishmaniasis. *J Glob Infect Dis.* 2010;2(2):167-176.

Cuervo P, Cupolillo E, Nehme N, Hernandez V, Saravia N, Fernandes O. *Leishmania (Viannia)*: genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Exp Parasitol.* 2004 Sep-Oct;108(1-2):59-66.

Cunningham ML, Fairlamb AH. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *Eur J Biochem.* 1995;230(2):460-468.

Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A, et al. 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. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;50, 3, 296-311.

Desjeux P. The increase in risk factors for the leishmaniasis Worldwide. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 2001;95:239–243.

Ferreira GA, Soares FC, Vasconcelos SA, Rodrigues BH, Werkhauser RP, de Brito ME, et al. Discrimination of *Leishmania braziliensis* variants by kDNA signature produced by LSSP-PCR. *The Journal of Parasitology*. 2007; 93,712-714.

Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Res Microbiol*. 2004;155(4):224-230.

Garcia AL, Kindt A, Quispe-Tintaya KW, Bermudez H, Llanos A, Arevalo J, et al. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infect Genet Evol*. 2005;5(2):109-16.

Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*. 1993;6(3):230-250.

Grögl M, Ayoade MJ, Cordero LDC, Kyle DE. *Leishmania* ssp.: Development of pentostam-resistant clones in vitro by discontinuous drug exposure. *Exp Parasitol*. 1989; 69:78-90.

Grögl M, Thomason T, 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.

Hanafi R, Barhoumi M, Ali SB, Guizani I. Molecular analyses of Old World *Leishmania* RAPD markers and development of a PCR assay selective for parasites of the *L. donovani* species Complex. *Exp Parasitol*. 2001;98(2):90-99.

Hoare C, Wallace F. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology. *Nature*. 1966;212:1358-1996.

Ishikawa EA, Silveira FT, Magalhaes AL, Guerra junior RB, Melo MN, Gomes R, et al. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002; 96(1):S111-S1121.

Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*. 2006;22:439–445.

- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press; 1987. p.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;82(3):421-424.
- Laurent T, Rijal S, Yardley V, Croft S, De Doncker S, Decuypere S, et al. Epidemiological dynamics of antimonial resistance in *Leishmania donovani*: genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally-resistant clinical isolates from Nepal. *Infect Genet Evol*. 2007;7(2):206-212.
- Marsden PD. Current concepts in parasitology. Leishmaniasis. *N Engl J Med*. 1979;300(7):350-352.
- Marsden PD. Clinical presentations of *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Parasitol Today*. 1985<sup>a</sup>;1(5):129-33.
- Marsden PD. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. *Rev Soc Bras Med Trop* 1985<sup>b</sup>;18: 187-198.
- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986;80(6):859-876.
- Martinez E, Alonso V, Quispe A, Thomas MC, Alonso R, Pinero JE, et al. RAPD method useful for distinguishing *Leishmania* species: design of specific primers for *L. braziliensis*. *Parasitology*. 2003;127(6):513-517.
- Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica*. 1994;10(2):359-375.
- Marzochi MC. A Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1992;63:82-104.
- Matos DS, Azeredo-Coutinho RB, Schubach A, Conceição-Silva F, Baptista C, Moreira JS, et al. Differential interferon- gamma production characterizes the cytokine responses to *Leishmania* and *Mycobacterium leprae* antigens in concomitant mucocutaneous leishmaniasis and lepromatous leprosy. *Clin Infect Dis*. 2005;40:5-12
- Ministério da Saúde (Brasil). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2010.
- Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem*. 2007;14(10):1153-1169.

Mookerjee BJ, Mookerjee A, Banerjee R, Saha M, Singh S, Naskar K, et al. Inhibition of ABC transporters abolishes antimony resistance in *Leishmania* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(3):1080-1093.

Momen H, Grimaldi G Jr, Pacheco RS, Jaffe CL, McMahon-Pratt D, Marzochi MC. Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg*. 1985;34(6):1076-1084.

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(3):528-534.

Nussbaum K, Honek J, Cadmus CM, Efferth T. Trypanosomatid parasites causing neglected diseases. *Curr Med Chem*. 2010;17(15):1594-1617.

de Oliveira FS, Valette-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;66(4):361-365.

de Oliveira-Neto MP, Mattos Mda S. An alternative antimonial schedule to be used in cutaneous leishmaniasis when high doses of antimony are undesirable. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(4):323-326.

de Oliveira-Neto MP, Mattos Mda S. Successful therapeutic response of resistant cases of mucocutaneous leishmaniasis to a very low dose of antimony. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(4):376-378.

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):651-655.

Ouellette M, Papadopoulou B. Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasitol Today*. 1993;9:150-153.

Pacheco RS, Martinez JE, Valderrama L, Momen H, Saravia NG. Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol*. 1995;69(2):197-209.

Pacheco RS, Grimaldi G Jr, Momen H, Morel CM. Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. *Parasitology*. 1990;100(3):393-8.

Pacheco RS, Brito CMM, Sarquis O, Pires MQ, Borges-Pereira J & Lima MM. Genetic heterogeneity in *Trypanosoma cruzi* stains from naturally infected triatomine vectors in Northeastern Brazil: Epidemiological implications. *Biochem.Genet*. 2005;43:519-530.

Passos VM, Fernandes O, Lacerda PA, Volpini AC, Gontijo CM, Degraive W et al. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* is the predominant species infecting patients with

American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Trop.* 1999;72(3):251-258.

Pimentel MIF, Baptista C, Rubim EF, Vasconcellos ECF, Lyra MR, Salgueiro MM et al. American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* resistant to meglumine antimoniate and with good response to pentamidine: a case report. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011. *In press.*

Rijal S, Yardley V, Chappuis F, Decuyper S, Khanal B, Singh R, et al. Antimonial treatment of visceral leishmaniasis: are current in vitro susceptibility assays adequate for prognosis of in vivo therapy outcome? *Microbes Infect.* 2007 Apr;9(4):529-35.

Robledo SM, Valencia AZ, Saraiva NG. Sensitivity to Glucantime of *Leishmania viannia* isolated from patients prior to treatment. *J Parasitol.* 1999;85(2):360-366.

Roberts WL, Berman JD, Rainey PM. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonials preparations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1234-1239.

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; 39:139-145.

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;193(10):1375-1383.

Saravia NG, Weigle K, Segura I, Giannini SH, Pacheco R, Labrada LA et al. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection-reativation or reinfection? *Lancet* 1990;336, 398-402.

Schubach A, Marzochi KB, Moreira JS, Schubach TM, Araujo ML, Vale AC, et al. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38: 213-217

Sereno D, Cordeiro da Silva A, Mathieu-Daude F, Ouaisi A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int.* 2007;56(1):3-7.

Shaw J. The leishmaniasis-survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(5):541-547.

Tuon FF, Amato VS, Graf ME, Siqueira AM, Nicodemo AC, Amato Neto V. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis. *Int J Dermatol.* 2008;47(2):109-124.

Unger A, O'Neal S, Machado PR, Guimarães LH, Morgan DJ, Schriefer A, et al. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer

development with high rate of failure in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80(4):574-579.

Vasconcellos ECFE, Schubach AO, Valet-Rosalino CM, Coutinho RS, Conceição-Silva F, Salgueiro MM, et al American tegumentary leishmaniasis in older adults: 44 cases treated with an intermittent low-dose antimonial schedule in Rio de Janeiro, Brazil. *J Am Geriatr Soc.* 2010 Mar;58(3):614-6.

Vermeersch M, da Luz RI, Toté K, Timmermans JP, Cos P, Maes L. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(9):3855-9.

WHO [HOMEPAGE NA INTERNET]. Leishmaniasis. [ACESSO EM 28 JAN 2011]. DISPONÍVEL EM: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>

W.H.O. World Health Organization Control of Leishmaniasis. Technical Report Series 2008:793.

Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Doncker SD, Ramirez L, et al. American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *J Infect Dis.* 2006;194(8):1168-75.

Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Pereira LI, Pelli de Oliveira MA, Ribeiro-Dias F, et al. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health.* 2010;15(1):68-76.

**ANEXOS**

**ANEXOS 1. TERMO DE CONSENTIMENTO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****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 21040-900****TELEFONES: (0xx21) 3865-9525 / 3865-9541 / FAX (0xx21) 3865-9541****NOME DO PROJETO DE PESQUISA:**

Ensaio clínico fase III para Leishmaniose Tegumentar Americana. Equivalência entre o esquema padrão e alternativos com antimoniato de meglumina

**NOME DO VOLUNTÁRIO:**  

---

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 leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença causada por parasitos chamados Leishmanias e que 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.

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) recomenda tratar os pacientes com LTA com antimoniato de meglumina em altas doses (20mg por kilograma de peso por dia) durante 20 a 30 dias, respeitando o limite máximo de 3 ampolas diárias.. Entretanto, alterações

nos rins, coração, fígado, pâncreas e no sangue são freqüentes. Além de dores nas juntas e desconforto no local de aplicação das injeções por via intramuscular.

No Centro de Referência em Leishmanioses (CRLeish) do IPEC, Fiocruz, uma dose baixa de antimoniato de meglumina (5 mg por quilograma de peso por dia) tem se revelado eficaz e bem tolerada no tratamento de pacientes com LTA. Os pacientes com a forma cutânea são tratados por 30 dias. Os pacientes com forma mucosa são tratados continuamente, por um mínimo de 30 dias, preferencialmente sem interrupção, até a cicatrização das mucosas, o que costuma ocorrer entre 30 e 90 dias de tratamento. Pacientes idosos ou com outras doenças associadas são tratados com doses baixas em séries de 10 dias com intervalos de 10 dias sem medicação. Pacientes que apresentem contra-indicação para receber o tratamento por via intramuscular ou que apresentem sinais de intoxicação durante o tratamento, poderão ser tratados com uma ou duas aplicações de antimoniato de meglumina diretamente na lesão de pele.

Nossa experiência acumulada sugere que os esquemas de tratamento alternativos apresentam os mesmos bons resultados que o esquema padrão recomendado pelo MS, porém, com menos efeitos adversos. Entretanto, somente após a conclusão deste estudo, poderemos sugerir ao MS que altere as recomendações para o tratamento da LTA.

Agora que o seu diagnóstico de LTA foi confirmado, você está sendo convidado a participar de uma investigação clínica a ser realizada no IPEC-Fiocruz, com os seguintes objetivos:

Avaliar a resposta ao tratamento da LTA com o uso de diferentes doses ou formas de aplicação de antimoniais

Descrever o comportamento dos antimoniais no corpo humano de acordo com os diferentes esquemas de tratamento

Comparar a resposta imunológica de pacientes tratados com os diferentes esquemas

Caracterizar os isolados de *Leishmania* e verificar a sensibilidade ao antimonial

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 que a indicação do seu tratamento para forma cutânea de LTA, com antimoniato de meglumina por via intramuscular, seja feita por sorteio para um dos seguintes grupos: 1) dose alta por 20 dias contínuos; 2) dose alta em 2 séries de 10 dias; 3) dose baixa por 30 dias contínuos; 4) dose baixa em 3 séries de 10 dias. Caso haja alguma contra-indicação para você receber qualquer desses esquemas, o tratamento será realizado com uma ou duas aplicações da medicação, com um intervalo de duas semanas, diretamente na lesão de pele. Em caso de forma mucosa você poderá ser sorteado para um dos seguintes grupos: 1) dose alta por 30 dias; 2) dose baixa diariamente até a cura. Os médicos que irão avaliar o seu tratamento não saberão qual o esquema utilizado e você não saberá se estará tratando com dose alta ou baixa, para não serem influenciados no julgamento.

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.

Participando deste estudo você terá algumas responsabilidades: seguir as instruções do seu médico; comparecer à unidade de saúde nas datas marcadas; e relatar a seu médico todas as reações que você apresentar durante o tratamento, tanto positivas quanto negativas. Os exames e procedimentos aplicados lhe serão gratuitos. Você receberá todos os cuidados médicos adequados para a sua doença. Caso você necessite de atendimento médico, durante o período em que estiver participando do estudo, mesmo fora do seu agendamento, procure o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz. Em caso de necessidade ligue para o Dr. Armando de Oliveira Schubach, Dra. Cláudia Maria Valete Rosalino, Dra. Rilza Beatriz, Dra. Érica Vasconcellos, Dra. Mariza Salgueiro, Dra. Ana Cristina nos telefones acima. Caso você apresente qualquer

problema que necessite de internação, a equipe médica providenciará seu leito no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz.

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.

**Inconvenientes e riscos principais conhecidos até os dias atuais:** O medicamento glucantime costuma causar efeitos indesejáveis, não deve 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").

**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 não beneficiá-lo diretamente, mas no futuro, poderão beneficiar outras pessoas, pois espera-se que este estudo contribua para que o acompanhamento do tratamento de pacientes com LTA possa ser feito de forma mais eficaz e segura.

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

**ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****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 21040-900****TELEFONES: (0xx21) 3865-9525 / 3865-9541 / FAX (0xx21) 3865-9541****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, 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:

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.

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.

Isolar, identificar e comparar as leishmanias causadoras 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 anti-alérgicos. 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.

O 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 testemunha<sup>1</sup>:

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Nome testemunha<sup>2</sup>:

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
<sup>1</sup> 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.