



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
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

LUCIANA DE FREITAS CAMPOS MIRANDA

SENSIBILIDADE AO ANTIMONIAL PENTAVALENTE *IN VITRO*
DE AMOSTRAS DE *Leishmania (Viannia) braziliensis*
ISOLADAS ANTES E APÓS O TRATAMENTO DE PACIENTES
COM FALHA TERAPÊUTICA

RIO DE JANEIRO

2011

SENSIBILIDADE AO ANTIMONIAL PENTAVALENTE *IN VITRO*
DE AMOSTRAS DE *Leishmania (Viannia) braziliensis*
ISOLADAS ANTES E APÓS O TRATAMENTO DE PACIENTES
COM FALHA TERAPÊUTICA

LUCIANA DE FREITAS CAMPOS MIRANDA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para a obtenção de grau de Mestre em Ciências.

Orientado por Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Madeira.

RIO DE JANEIRO

2011

LUCIANA DE FREITAS CAMPOS MIRANDA

Sensibilidade ao antimônio pentavalente *in vitro* de amostras de *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas antes e após o tratamento de pacientes com falha terapêutica.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para a obtenção de grau Mestre em Ciências.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Madeira.

Prof^a. Dr^a. Cibele Baptista.

Aprovada em: 25 / 02 / 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Armando de Oliveira Schubach (Presidente)

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz

Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Valete Rosalino (Componente)

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz

Prof^a. Dr^a. Dilvani Oliveira Santos (Componente)

Universidade Federal Fluminense (UFF)

Prof^a. Dr^a. Aline Fagundes da Silva (Suplente)

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz

*Dedico este trabalho aos **meus pais Antonio e Deise** e ao meu **esposo Renan**, por todo amor, incentivo e orações.*

*À **Dra. Fátima**, pela força, orientação e ensinamentos.*

*Ao meu querido avô **Orlando** (in memorian).*

“A verdadeira medida de um homem não se vê na forma como se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas em como se mantém em tempos de controvérsia e desafio.”

Pastor Martin Luther King Jr.

“Sabemos que Deus age em todas as coisas para o bem daqueles que o amam, dos que foram chamados de acordo com o Seu propósito.”

Romanos 8:28 (Bíblia Sagrada)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a **Deus** pelo seu grande amor, por sua imensa bondade e por ser tão fiel!

“Senhor, nunca me deixes esquecer que tudo o que tenho, tudo o que sou e o que vier a ser, vem de Ti meu Deus!”

À minha orientadora, **Dra. Fátima**, pois a cada dia me impressiona com sua dedicação ao trabalho, atenção aos alunos, compromisso com a pesquisa e a formação de novos pesquisadores, e acima de tudo, uma pessoa muito humana e comprometida com a justiça! Agradeço a Deus a oportunidade de estar trabalhando e sendo orientada por esta pessoa tão especial!

Ao **Dr. Armando**, pois além de ser excelente pesquisador e coordenador, é uma pessoa justa e sensata. Agradeço imensamente por ter me ajudado a superar grandes dificuldades encontradas para a conclusão deste mestrado e por ter viabilizado minha ida para o Laboratório Vigileish.

Aos meus **pais Antonio e Deise**, pelo amor, pela educação e pelas orações.

Ao meu querido esposo **Renan** e à minha “cunhada-filha” **Jhamylle**, pelo amor e compreensão nos momentos mais difíceis que passei neste mestrado.

À minha avó **Lourdes** e aos meus irmãos **Marco Antonio** e **Denise**, e minha linda sobrinha **Thalita**, por serem tão especiais em minha vida!

À minha co-orientadora **Dra. Cibele**, pelos ensinamentos, apoio, amizade e ajuda em todos os momentos que precisei.

Alessandra, Andreia, Célia, Cíntia Cristiane, Cíntia Mello, Eduardo e **Juliana** pelos treinamentos nas rotinas do Laboratório Vigileish.

À **Tatiana** e toda equipe do **Laboratório de Vigilância em Leishmanioses** e do **Laboratório de Parasitologia**, IPEC/Fiocruz, pela amizade e convivência harmoniosa.

A todos os **parentes, amigos e colegas**, que participaram direta ou indiretamente deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Miranda, L.F.C. **Sensibilidade ao antimonial pentavalente *in vitro* de amostras de *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas antes e após o tratamento de pacientes com falha terapêutica.** Rio de Janeiro, 2011 75 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

Os antimoniais pentavalentes representam a principal opção para tratamento das leishmanioses, sendo utilizado no Brasil, o antimoniato de meglumina (Glucantime®). A variabilidade da resposta ao tratamento pode estar condicionada a fatores relacionados ao hospedeiro, aos parasitas ou mesmo aos esquemas terapêuticos empregados. Neste estudo, avaliamos amostras de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em ensaios *in vitro* quanto à sensibilidade ao antimoniato de meglumina. Foram comparadas as DL₅₀ observadas, tanto para formas promastigotas quanto para formas amastigotas, de amostras isoladas no momento do diagnóstico antes do tratamento (amostra **A**) e de amostras isoladas após o primeiro ciclo de tratamento (amostra **B**). Sete pares de amostras (**A** e **B**) foram selecionados, sendo quatro isolados de pacientes com falha terapêutica e três de pacientes com reativação. As formas promastigotas foram expostas a concentrações de antimoniato de meglumina entre 3,955 µg e 8,1 mg/mL e avaliadas após 24 e 48 horas de exposição. As formas amastigotas, em macrófagos murinos, foram expostas a concentrações de 20, 40 e 80 µg/mL de antimoniato de meglumina, cuja cinética de infecção foi avaliada em intervalos de 0, 24, 48 e 72 horas, baseada em dois parâmetros: percentual de células infectadas e número médio de amastigotas por macrófago. Todas as amostras **B** de formas promastigotas apresentaram valores da DL₅₀ superiores aos obtidos com as amostras **A**, exceto para as amostras de um paciente. Nos ensaios com formas amastigotas, as amostras **B** apresentaram valores da DL₅₀ mais elevados que a amostra **A** em 4 casos, com aumentos que variaram de 17 a 20% em 3 pacientes e de 100% em um caso. Nos demais pacientes, os valores da DL₅₀ de **A** e **B** foram semelhantes. 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 a resposta ao tratamento. É possível que outros fatores relacionados aos pacientes, tais como a condição imunológica e a resposta frente à infecção possam influenciar na resposta à terapêutica antimonial.

Palavras-chave: 1. *Leishmania braziliensis* 2. Leishmaniose cutânea 3. Terapêutica 4. Antimoniato de meglumina 5. Falha terapêutica 6. Sensibilidade *in vitro*.

Miranda, L.F.C. **Susceptibility of samples of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated before and after treatment of patients with therapeutic failure to pentavalent antimonials.** Rio de Janeiro, 2011 75 f. Dissertation [Master in Clinical Research in Infectious Diseases] Evandro Chagas Clinical research Institute.

ABSTRACT

Pentavalent antimonials are the first drug of choice for leishmaniasis treatment and in Brazil meglumine antimoniate (Glucantime®) is used. The variability of the response to treatment may be conditioned to factors related to the host, the parasites or even the therapeutic plan. In this study we assessed the susceptibility to meglumine antimoniate of samples of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in in vitro tests. We compared the DL₅₀ of both promastigote and amastigote forms of samples isolated at diagnosis before treatment (sample **A**) and samples isolated after the first cycle of treatment (sample **B**). Seven pairs of samples (**A** and **B**) were selected, four isolated from patients with treatment failure and three from patients with reactivation. The promastigote forms were exposed to meglumine antimoniate concentrations between 3,955 µg and 8,1 mg/mL and were assessed after 24 and 48 hours of exposition. The amastigotes, in murine macrophages, were exposed to concentrations of 20, 40 and 80 µg/mL of meglumine antimoniate, and the infection kinetics was assessed at time intervals of 0, 24, 48 and 72 hours, through two parameters: percentage of infected cells and average number of amastigotes per macrophage. All **B** samples of promastigotes presented DL₅₀ values higher than those obtained with **A** samples, except for one patient. In tests with amastigotes, the **B** samples showed higher DL₅₀ values than sample **A** in 4 cases, with increases ranging from 17 to 20% in 3 patients and 100% increase in one case. In other patients, DL₅₀ values of **A** and **B** were similar. One of the seven patients studied abandoned treatment and six were clinically healed after retreatment with Anphotericin B (4 cases) or meglumine antimoniate (2 cases). It was not possible to correlate the results of this study with the clinics or response to treatment. It is possible that other patient related factors such as immunological condition or response to infection may influence the response to antimonial treatment.

Keywords: 1. *Leishmania braziliensis* 2. Cutaneous Leishmaniasis 3. Therapeutics 4. Meglumine Antimoniate 5. Treatment failure 6. In vitro Susceptibility.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: A. Formas amastigotas de *Leishmania* sp. infectando macrófago. B. Forma promastigota de *Leishmania* sp..... 2**
- Figura 2: Esquema da placa de cultura de 96 poços onde foram avaliadas as amostras A e B expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina..... 20**
- Figura 3: Perfil da curva de crescimento das formas promastigotas de *L. braziliensis* isoladas de sete pacientes com LC. Amostra A obtida no momento do diagnóstico, antes do tratamento, e amostra B obtida após tratamento com antimoniato de meglumina de pacientes com falha terapêutica ou reativação das lesões cutâneas. 25**
- Figura 4: Identificação gráfica do percentual de inibição de formas promastigotas obtidas com as amostras A e B do paciente nº 1 (AES) expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina nos tempos de 24 e 48 horas. 27**
- Figura 5: Identificação gráfica do percentual de inibição de formas promastigotas obtidas com as amostras A e B do paciente nº 2 (ALS) expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina nos tempos de 24 e 48 horas. 28**
- Figura 6: Identificação gráfica do percentual de inibição de formas promastigotas obtidas com as amostras A e B do paciente nº 3 (ILC) expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina nos tempos de 24 e 48 horas. 29**
- Figura 7: Identificação gráfica do percentual de inibição de formas promastigotas obtidas com as amostras A e B do paciente nº 4 (DSC) expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina nos tempos de 24 e 48 horas. 30**
- Figura 8: Identificação gráfica do percentual de inibição de formas promastigotas obtidas com as amostras A e B do paciente nº 5 (TSA) expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina nos tempos de 24 e 48 horas. 31**
- Figura 9: Identificação gráfica do percentual de inibição de formas promastigotas obtidas com as amostras A e B do paciente nº 6 (ECR) expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina nos tempos de 24 e 48 horas. 32**
- Figura 10: Identificação gráfica do percentual de inibição de formas promastigotas obtidas com as amostras A e B do paciente nº 7 (DCA) expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina nos tempos de 24 e 48 horas. 33**

- Figura 11: Macrófagos infectados com formas amastigotas de *L. braziliensis*. A. Controle (24 horas). B. Antimoniato de meglumina 40µg (24 horas). C. Antimoniato de meglumina 40µg (48 horas). D. Antimoniato de meglumina 40µg (72 horas). 34**
- Figura 12: Percentual de células infectadas (linhas) e número médio de amastigotas intracelulares (colunas) das amostras A e B do paciente nº 1 e seus respectivos controles, quando expostos as concentrações de 20µg, 40µg e 80µg de antimoniato de meglumina. 36**
- Figura 13: Percentual de células infectadas (linhas) e número médio de amastigotas intracelulares (colunas) das amostras A e B do paciente nº 2 e seus respectivos controles, quando expostos as concentrações de 20µg, 40µg e 80µg de antimoniato de meglumina. 37**
- Figura 14: Percentual de células infectadas (linhas) e número médio de amastigotas intracelulares (colunas) das amostras A e B do paciente nº 3 e seus respectivos controles, quando expostos as concentrações de 20µg, 40µg e 80µg de antimoniato de meglumina. 38**
- Figura 15: Percentual de células infectadas (linhas) e número médio de amastigotas intracelulares (colunas) das amostras A e B do paciente nº 4 e seus respectivos controles, quando expostos às concentrações de 20µg, 40µg e 80µg de antimoniato de meglumina. 39**
- Figura 16: Percentual de células infectadas (linhas) e número médio de amastigotas intracelulares (colunas) das amostras A e B do paciente nº 5 e seus respectivos controles, quando expostos às concentrações de 20µg, 40µg e 80µg de antimoniato de meglumina. 40**
- Figura 17: Percentual de células infectadas (linhas) e número médio de amastigotas intracelulares (colunas) das amostras A e B do paciente nº 6 e seus respectivos controles, quando expostos às concentrações de 20µg, 40µg e 80µg de antimoniato de meglumina. 41**
- Figura 18: Percentual de células infectadas (linhas) e número médio de amastigotas intracelulares (colunas) das amostras A e B do paciente nº 7 e seus respectivos controles, quando expostos às concentrações de 20µg, 40µg e 80µg de antimoniato de meglumina. 42**
- Figura 19: Gráficos das curvas dose-resposta obtidos para cada par de 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. 44**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Esquema terapêutico preconizado para as diversas formas clínicas de LTA, segundo OMS e Ministério da Saúde (Adaptado de Goto & Lindoso, 2010). 9**
- Tabela 2: Dados dos sete pacientes com leishmaniose cutânea, cujos pares de amostras de *Leishmania braziliensis* foram isolados antes do tratamento e após falha terapêutica ou reativação das lesões..... 24**
- Tabela 3: Valores de DL₅₀ (mg/mL) com desvio padrão obtidos para formas promastigotas das amostras A e B de *Leishmania braziliensis* avaliadas nos intervalos de 24 e 48 horas de exposição a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina. 26**
- Tabela 4: Valores de DL₅₀ (µg/mL) para formas amastigotas obtidos no ponto de 48 horas de exposição ao antimoniato de meglumina, para as amostras A e B dos sete pacientes avaliados neste estudo..... 43**

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI (Brain Heart Infusion): Meio de cultura infusão de cérebro e coração
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA: Comitê de Ética na Utilização de Animais
CO₂: Dióxido de Carbono
DL₅₀: Dose do fármaco necessária para a letalidade de 50% dos parasitas
DNA: Ácido desoxirribonucleico
ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): Ensaio imunoenzimático indireto
EV: Endovenosa
g: Grama
HIV (Human immunodeficiency vírus): Vírus da imunodeficiência humana
IDRM: Intradermorreação de Montenegro
IL: Intralesional
IM: Intramuscular
IPEC: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
Kg: quilograma
LC: Leishmaniose cutânea
LCM: Leishmaniose cutâneo-mucosa
LM: Leishmaniose mucosa
LT: Leishmaniose tegumentar
LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana
LV: Leishmaniose Visceral
mg: Miligrama
mL: Mililitro
mm: Milímetro
MS: Ministério da Saúde
NNN: Meio de cultura de Novy, Nicolle e McNeal
OMS: Organização Mundial de Saúde
PCR: Reação em Cadeira da Polimerase
PBS: Solução Tampão Fosfato Salina
RIFI: Reação de imunofluorescência indireta
SFB: Soro Fetal Bovino
Sb^V: antimônio pentavalente
U: Unidade
Vigileish: Laboratório de Vigilância em Leishmanioses
µg: Micrograma
µL: Microlitro

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. As leishmanioses – considerações gerais | 1 |
| 1.2. Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) 3 | |
| a) Forma cutânea localizada | 3 |
| b) Forma cutânea disseminada..... | 4 |
| c) Forma cutânea difusa | 4 |
| d) Leishmaniose mucosa (LM)..... | 4 |
| 1.3. Diagnóstico..... | 5 |
| 1.4. Terapêutica nas leishmanioses..... | 6 |
| 1.4.1. Fármaco de primeira linha: antimonial pentavalente | 6 |
| 1.4.2. Fármacos de segunda linha: Anfotericina B e Pentamidina..... | 8 |
| 1.4.3. Definições relacionadas aos esquemas terapêuticos e critérios de cura utilizados pelo Ministério da Saúde brasileiro (MS)..... | 11 |
| 1.4.4. Definições relacionadas aos esquemas terapêuticos e critérios de cura adotados pelo Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (Vigileish/ IPEC/ FIOCRUZ)..... | 12 |
| 1.4.5. Mecanismos de ação do antimonial pentavalente..... | 13 |
| 1.5. Ensaios <i>in vitro</i> de sensibilidade aos fármacos..... | 14 |
| 2. OBJETIVOS | 16 |
| 2.1. Geral..... | 16 |
| 2.2. Específicos..... | 16 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 3.1. Delineamento do estudo..... | 17 |
| 3.2. Aspectos éticos..... | 17 |
| 3.3. Critério de seleção dos pacientes e amostras | 17 |
| 3.4. Curva de crescimento de formas promastigotas..... | 18 |
| 3.5. Ensaios de avaliação da sensibilidade ao antimonial pentavalente..... | 19 |
| 3.5.1. Ensaio com formas promastigotas | 19 |
| 3.5.2. Ensaio com formas amastigotas..... | 21 |
| 4. RESULTADOS | 23 |
| 4.1. Pacientes e amostras selecionadas para o estudo | 23 |
| 4.2. Curva de crescimento..... | 24 |
| 4.3. Avaliação da sensibilidade ao antimonial pentavalente..... | 26 |
| 4.3.1. Formas promastigotas..... | 26 |
| 4.3.2. Formas amastigotas | 34 |
| 5. DISCUSSÃO | 45 |
| 6. CONCLUSÕES | 53 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 54 |
| ANEXOS | 61 |
| Anexo A – Aprovação no CEP | 62 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. As leishmanioses – considerações gerais

As leishmanioses são doenças causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Clinicamente são classificadas em: Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT) e afetam cerca de 12 milhões de pessoas no mundo. Estão presentes em 88 países, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (SANTOS et al., 2008).

A incidência anual é de cerca de dois milhões de novos casos e cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas, dados que revelam a importância desta doença negligenciada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Historicamente, a LT era considerada uma doença rural, afetando fazendeiros e outros habitantes de áreas rurais. Entretanto, este perfil epidêmico tem mudado e a transmissão desta doença tem sido relatada na interface de áreas rurais e urbanas, entre pessoas de qualquer idade ou sexo (SANTOS et al., 2008). Há, porém, predominância entre os maiores de 10 anos (90% dos casos) e os do sexo masculino (74%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Existem várias espécies de *Leishmania* associadas à doença humana. Segundo a classificação taxonômica proposta por Lainson & Shaw (1987), as espécies de *Leishmania* são classificadas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. No Brasil, a leishmaniose tegumentar é causada por seis espécies do subgênero *Viannia*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lindenbergi* e uma espécie do subgênero *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis*. A espécie mais amplamente distribuída é *L. (V.) braziliensis*. A prevalência da infecção humana varia com a região geográfica e a espécie de *Leishmania* envolvida.

Leishmania sp. é um parasita digenético (heteroxeno), cujo ciclo vital se alterna entre dois hospedeiros (vertebrado e invertebrado), apresentando-se sob duas formas evolutivas: amastigotas e promastigotas. As amastigotas são arredondadas, com flagelo rudimentar não exteriorizado, e se localizam no

vacúolo parasitóforo das células do sistema fagocitário mononuclear, especialmente macrófagos dos hospedeiros vertebrados. À medida que as amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem liberando parasitas que serão fagocitados por outros macrófagos.

Já as formas promastigotas são alongadas, possuem flagelo livre e se desenvolvem no tubo digestivo dos insetos vetores e em culturas axênicas (Figura 1).

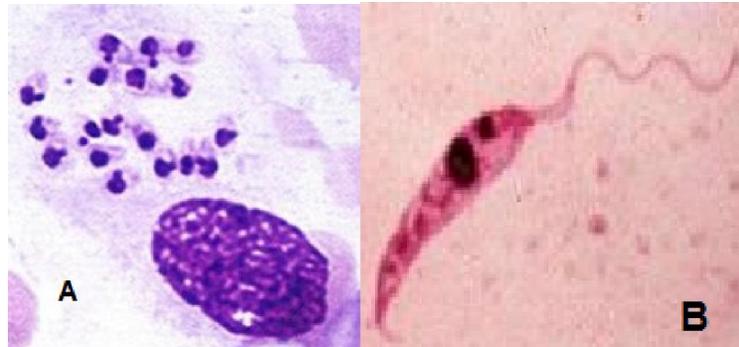


Figura 1: A. Formas amastigotas de *Leishmania* sp. infectando macrófago. B. Forma promastigota de *Leishmania* sp.

A transmissão das leishmanioses ocorre através de vetores do gênero *Phlebotomus* no velho mundo e *Lutzomyia* no novo mundo. A contaminação dos flebotomos ocorre no momento em que a fêmea, ao fazer seu repasto sanguíneo, ingere macrófagos parasitados. Os parasitas, no tubo digestivo do vetor, se diferenciam para formas promastigotas e se multiplicam por fissão binária, localizando-se no esôfago e nas glândulas salivares. Durante o próximo hematofagismo, as formas infectantes (promastigotas metacíclicas) são transmitidas aos hospedeiros vertebrados (NUSSBAUM et al., 2010).

Na LT, já foram registrados, como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais, algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres. São numerosos os registros de infecção em animais domésticos. Entretanto, não há evidências científicas que comprovem o papel desses animais como reservatórios das espécies de *Leishmania*, sendo considerados hospedeiros acidentais da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Tanto a leishmaniose tegumentar quanto a visceral encontram-se em expansão no mundo. Embora muitos avanços tenham sido alcançados desde a descrição do gênero *Leishmania*, em 1903, problemas relacionados ao

diagnóstico, tratamento e controle ainda persistem, o que reflete a complexidade etiológica e epidemiológica deste grupo de doenças.

1.2. Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A variedade de manifestações clínico-patológicas da doença é atribuída a uma complexa interação de fatores ligados a espécies do parasito, resposta imunológica do paciente e, conseqüentemente, fatores resultantes da interação parasito-hospedeiro. Nas Américas, as descrições clínicas de LT referem-se à infecção por *L. braziliensis*. Entretanto, particularidades clínicas relacionadas às infecções por diferentes espécies de *Leishmania* vêm sendo descritas (AREVALO et al., 2007).

A LT é uma doença dermatológica cuja magnitude, potencial endêmico e espectro clínico merecem a atenção do serviço público de saúde. As úlceras cutâneas podem ser causadas por qualquer uma das espécies dermatrópicas de *Leishmania* anteriormente citadas. Após um período de incubação de 1 a 3 meses, podendo se estender a até um ano, surge a lesão no local da picada do inseto vetor.

De acordo com Marzochi & Marzochi (1994) as manifestações clínicas produzidas no homem podem ser classificadas em:

a) Forma cutânea localizada

É o tipo de apresentação mais comum da LTA. A úlcera cutânea típica é indolor, arredondada ou ovóide, de tamanho variável, com bordas bem delimitadas, elevadas e eritematosas, fundo granuloso e que sangra facilmente. Havendo infecção bacteriana associada, um exsudato amarelado pode estar presente. Também são descritas formas não ulcerosas que podem se apresentar com aspecto nodular, verrucoso ou liquenóide (DA-CRUZ & PIRMEZ, 2005). As lesões se localizam preferencialmente em áreas descobertas, como membros superiores e inferiores. Entretanto, a localização em áreas pouco relatadas como a região genital e rebordo ungueal, pode trazer dificuldade no diagnóstico em função da apresentação dermatológica pouco comum (OLIVEIRA-NETO, 1998). O comprometimento dos gânglios linfáticos é frequente, podendo preceder as lesões cutâneas (BARRAL et al., 1995). Ao

regredirem, as úlceras deixam cicatrizes com dimensões que se mantêm nos limites da úlcera, em geral lisas, brilhantes, finas e sedosas, com áreas de hiper ou de hipopigmentação, podendo assumir a coloração natural da pele (SCHUBACH et al., 1998a; OLIVEIRA-NETO et al., 2000). A ocorrência de traumatismo da cicatriz pode levar à reativação da doença (OLIVEIRA-NETO et al., 1998), provavelmente relacionada à manutenção de parasitas no local (SCHUBACH et al., 1998b).

b) Forma cutânea disseminada

Pequenas lesões ulceradas, disseminadas ou múltiplas (acima de 10), distribuídas por diversas partes do corpo, distantes do local da picada e que costumam responder bem ao tratamento. Ocorre provavelmente por disseminação linfática ou hemática de *L. braziliensis* (CARVALHO et al., 1994; OLIVEIRA-NETO, 1998; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

c) Forma cutânea difusa

É uma manifestação rara e grave, causada por *L. amazonensis*. Embora essa espécie possa causar lesões cutâneas localizadas, quando acomete pacientes considerados anérgicos, com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*, o quadro clínico se manifesta de forma arrastada, com frequentes recidivas e não respondem ao tratamento pelos antimoniais. As lesões são nodulares e múltiplas, com formação de placas infiltradas. Embora ocorra em diversos estados brasileiros a prevalência da forma cutânea difusa é rara. O tratamento é difícil ou ineficaz (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

d) Leishmaniose mucosa (LM)

Neste caso, as lesões localizam-se nas mucosas. Normalmente são lesões secundárias à forma cutânea. Admite-se que cerca de 3 a 5% dos casos de LC, causados por *L. braziliensis* desenvolvam a forma mucosa (OLIVEIRA-NETO, 1998). *Leishmania braziliensis* é a principal espécie associada aos casos de lesão mucosa, embora outras espécies como *L. amazonensis* e *L. guyanensis* já tenham sido isoladas desta forma clínica (GRIMALDI & TESH, 1993). O intervalo de tempo entre a infecção inicial e o início das infecções mucosas é bastante variável. Porém, admite-se que, em mais da metade dos casos, esta evolução ocorra dentro de um período médio de seis anos (JONES

et al., 1987). As mucosas podem apresentar-se infiltradas e eritematosas. A evolução das lesões pode levar à destruição do septo nasal e ao acometimento do assoalho das fossas nasais, da orofaringe, da laringe e da traqueia, além da pele que recobre o nariz e a região supralabial. Outras regiões acometidas mais raramente são a conjuntiva ocular e a genitália (OLIVEIRA-NETO, 1998). Lesões de LM são mais resistentes à terapêutica antimonial e em geral não tendem a evoluir para resolução espontânea.

1.3. Diagnóstico

Devido às características imunobiológicas e ao espectro de manifestações da LTA, o diagnóstico nem sempre é uma tarefa fácil e deve associar os dados epidemiológicos, as características clínicas e os resultados dos testes laboratoriais.

A confirmação laboratorial por métodos parasitológicos é fundamental, tendo em vista o número de doenças que fazem diagnóstico diferencial com a LTA. O diagnóstico de certeza se dá pelo encontro do parasito nos tecidos ou fluidos biológicos dos hospedeiros. O exame direto baseia-se na pesquisa de formas amastigotas em lâminas de vidro preparadas com material extraído das lesões e coradas pelo Giemsa. As lâminas podem ser confeccionadas com: impressões de fragmentos teciduais obtidos por biópsia ou esfregaços de material raspado ou aspirado do bordo da lesão. Tanto os fragmentos teciduais quanto os aspirados do bordo da lesão podem ser cultivados em meio de cultura a base de ágar sangue, conhecido como meio Novy, McNeal e Nicole (NNN), acrescido de meio líquido Schneider (BASANO & CAMARGO, 2004; GOTO & LINDOSO, 2010).

Outra ferramenta importante para o diagnóstico da LTA é a intradermoreação de Montenegro (IDRM). Este teste avalia a resposta imune celular, através da injeção intradérmica de antígenos de *Leishmania*. A reação deve ser medida em 48 a 72 horas, sendo consideradas positivas as endurações com diâmetro igual ou superior a 5 mm. A IDRM não distingue entre infecção presente e passada. Por essa razão, é de pouco valor quando utilizada de forma isolada em áreas endêmicas. Porém, é um importante teste

de diagnóstico em viajantes originários de áreas não endêmicas (BASANO & CAMARGO, 2004; GOTO & LINDOSO, 2010).

A análise histopatológica é importante para o diagnóstico diferencial. A imunohistoquímica, embora não seja usada na rotina do diagnóstico, amplifica a chance de detecção do parasita ou mesmo de antígenos parasitários. Técnicas sorológicas, como a imunofluorescência indireta (RIFI) ou o ELISA, não são muito empregadas devido às características imunobiológicas da LTA, cuja resposta imune humoral é considerada baixa (BARROSO-FREITAS et al., 2009).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo amplamente utilizada no contexto do diagnóstico de várias doenças, principalmente pela elevada sensibilidade. Nas leishmanioses, não é empregada na rotina, pois requer equipamentos adequados e apresenta custo elevado (GOTO & LINDOSO, 2010). Além de contribuir para o diagnóstico, a PCR permite a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida (FAGUNDES et al., 2010).

Na prática, os métodos mais utilizados são a pesquisa direta de parasitas e a IDRM associados aos dados clínicos e epidemiológicos (BASANO & CAMARGO, 2004).

A sensibilidade de cada método de diagnóstico pode variar de acordo com a experiência de cada serviço, a qualidade do equipamento e dos insumos utilizados, o tempo de evolução das lesões, as formas clínicas e a espécie de *Leishmania* envolvida.

1.4. Terapêutica nas leishmanioses

Em 1912, o cientista brasileiro Gaspar Vianna demonstrou que o tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio trivalente) 1% determinava uma rápida cicatrização das lesões cutâneas. Entretanto, efeitos secundários graves foram descritos. Na tentativa de minimizar tais efeitos, desenvolveram-se outras formulações como os antimoniais pentavalentes, mais bem tolerados que os antimoniais trivalentes.

1.4.1. Fármaco de primeira linha: antimonial pentavalente

Desde a década de 1940, o tratamento das leishmanioses é baseado no uso de antimoniais pentavalentes complexados a carboidratos na forma de

estibogluconato de sódio (Pentostan®) ou de antimoniato de meglumina (Glucantime®). Ambos são efetivos na maioria dos casos, apesar dos efeitos secundários que acarretam.

O antimoniato de meglumina é usado no Brasil e em outros países da América Latina e é o fármaco de primeira escolha para o tratamento de todas as formas da doença (MISHRA et al., 2007). O Ministério da Saúde brasileiro distribui gratuitamente o medicamento através da rede pública de saúde.

O antimoniato de meglumina apresenta-se comercialmente como Glucantime®, em ampolas de 5mL, contendo 81 mg de Sb^V para cada mL, perfazendo um total de 405mg de Sb^V por ampola. As injeções devem ser feitas por via intramuscular (IM) ou endovenosa (EV), com repouso após a aplicação. A via IM pode apresentar o inconveniente da dor local. Vale ressaltar que não existe diferença entre as vias EV e IM, no que diz respeito à eficácia e segurança do fármaco (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Este medicamento não deve ser administrado em gestantes, pois 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 pelo vírus HIV, com idade acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Os efeitos adversos mais frequentes são artralgia e mialgia. Porém, alterações mais graves como cardíacas, renais, hematológicas, pancreáticas e hepáticas, que obrigam a suspensão do tratamento, podem ocorrer, principalmente, associadas a doses de 20mg Sb^V /kg/dia ou superiores. Esquemas alternativos com 5mg Sb^V /kg/dia ou por via intralesional têm sido utilizados com sucesso (OLIVEIRA- NETO et al., 1997a, 1997b; SCHUBACH et al., 2005).

A eficácia do antimoniato de meglumina no tratamento da LC varia segundo a região geográfica, a espécie de *Leishmania* e a apresentação clínica. No Brasil, a falha terapêutica foi observada em 29% dos pacientes (TUON et al., 2008), na Bolívia em 7% dos pacientes (BERMUDEZ et al., 2006), na Colômbia em 39% dos pacientes (PALACIOS et al., 2001) e no Peru a falha terapêutica variou de 8,3 a 30,4% dependendo da espécie de

Leishmania envolvida (AREVALO et al., 2007). Na LM as taxas de cura variam de 30 a 90% com os antimoniais, dependendo da região e do esquema terapêutico empregado (GOTO & LINDOSO, 2010).

1.4.2. Fármacos de segunda linha: Anfotericina B e Pentamidina

A anfotericina B tem sido usada no tratamento da leishmaniose e, em algumas partes do mundo, é o fármaco de escolha. Também é utilizada quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente ou na impossibilidade de seu uso, por exemplo, em gestantes. Este fármaco atua no ergosterol presente na membrana de *Leishmania*. Com o aumento da permeabilidade da membrana celular ocorre um influxo de íons, levando o parasita à morte (GOTO & LINDOSO, 2010).

A Anfotericina B lipossomal é uma nova formulação, na qual o fármaco é incorporado dentro de lipossomas compostos por fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. Isto não apenas reduz a toxicidade do fármaco, como também aumenta a eficiência e a concentração nos tecidos (SANTOS et al., 2008). No Brasil, esta formulação está registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso no tratamento da leishmaniose visceral. Existe um acúmulo de experiências relatadas na literatura que permite indicar o uso da anfotericina B lipossomal para leishmaniose tegumentar nos casos em que todas as demais opções terapêuticas sejam contra-indicadas ou tenham sido utilizadas sem sucesso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A principal desvantagem do uso de formulações lipossomais em países pobres é o custo elevado (SANTOS et al., 2008).

A pentamidina também é utilizada com sucesso no tratamento da LC e da LM em algumas regiões do novo mundo. Este fármaco interfere com a síntese de DNA de *Leishmania*, modificando a morfologia do cinetoplasto e promovendo a fragmentação da membrana mitocondrial, matando o parasita. A pentamidina tem apresentado a mesma eficácia dos antimoniais (TUON et al. 2008). Hipoglicemia e hiperglicemia são os principais efeitos adversos deste fármaco (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; GOTO & LINDOSO, 2010).

Os fármacos de segunda linha também são limitados pelos diversos efeitos colaterais e necessidade de administração parenteral (FRÉZARD et al., 2009).

Na tabela 1, apresentamos o esquema terapêutico preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pelo Ministério da Saúde do Brasil, em relação aos fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses.

Tabela 1: Esquema terapêutico preconizado para as diversas formas clínicas de LTA, segundo OMS e Ministério da Saúde (Adaptado de Goto & Lindoso, 2010).

| Forma Clínica | Antimonial Pentavalente | | Anfotericina B | | Pentamidina | |
|----------------------------|-------------------------|---|----------------|-------------------------------------|-------------|---------------------------------------|
| | OMS | Brasil | OMS | Brasil | OMS | Brasil |
| Cutânea Localizada | 20mg/kg/dia por 20 dias | 10-20 mg/kg/dia (15mg/Kg/dia) por 20 dias | ND | 1mg/kg/dia Dose total: 1 - 1,5 g | 4mg/kg/dia | 4mg/kg/dia Dose máxima total: 2,0g |
| Cutânea Disseminada | 20mg/kg/dia por 20 dias | 10-20 mg/kg/dia por 20 dias | ND | 1mg/kg/dia Dose total: 1 - 1,5 g | ND | 4mg/kg/dia Dose máxima total: 2,0g |
| Cutânea Difusa | 20mg/kg/dia por 20 dias | 20mg/kg/dia por 20 dias | ND | 1mg/kg/dia Dose total: 1 - 1,5 g | ND | ND |
| Mucosa | ND | 20mg/kg/dia por 30 dias | ND | 1mg/kg/dia Dose total: 2,5 – 3 g | ND | 4mg/kg/dia Dose máxima total: 2,0g |

ND: Não disponível

Diante das exposições acima, verificamos que o tratamento das leishmanioses envolve uma complexidade de fatores que deve ser considerada. Os fármacos disponíveis apresentam algumas limitações, como a diversidade de efeitos colaterais, necessidade de administração diária parenteral e a resistência ao fármaco. Nesse aspecto, a OMS recomenda que pesquisas de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses sejam incentivadas. Contudo, a falta de um significativo retorno comercial para as doenças negligenciadas, tem resultado em investimentos insuficientes para a

pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, tanto pelas agências do setor público quanto pelas indústrias farmacêuticas (FRÉZARD et al., 2009).

Apesar da falta de recursos, pesquisas têm sido conduzidas para o desenvolvimento de novos protocolos e tratamentos quimioterápicos. A química Medicinal, ciência responsável pelo processo de desenvolvimento de novos fármacos, vem ganhando impulso graças a recentes avanços tecnológicos, principalmente nas áreas da biologia estrutural, molecular e química computacional. Hoje o desenvolvimento racional de fármacos é uma realidade, abrindo novas perspectivas quanto à descoberta de novos medicamentos ou buscando o melhoramento daqueles existentes (LINARES et al., 2006).

Algumas alternativas são o desenvolvimento de fármacos a partir de microorganismos e de plantas; de novos medicamentos sintéticos como o Miltefosine (Impavido®), Paromomicina; e a associação de fármacos com citocinas para estimular o sistema imune (imunoterapia) (SANTOS et al., 2008).

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

1.4.3. Definições relacionadas aos esquemas terapêuticos e critérios de cura utilizados pelo Ministério da Saúde brasileiro (MS)

A falha no tratamento das leishmanioses constitui um problema muito comum em diversas áreas endêmicas (GROGL et al., 1992). Como mencionado anteriormente, a variabilidade de respostas à terapia nas leishmanioses pode ser devida a diversos fatores.

Segundo o manual do MS, o paciente deve retornar mensalmente à consulta durante três meses consecutivos após o término do esquema terapêutico para ser avaliada a cura clínica. O critério de cura é definido pela regressão de todos os sinais e comprovado pelo exame otorrinolaringológico, até seis meses após a conclusão do esquema terapêutico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

De acordo com o manual do MS, o tratamento regular para a forma cutânea é aquele que utiliza de 10 a 20mg Sb^V/Kg/dia entre 20 a 30 dias ou 20mg Sb^V/Kg/dia entre 30 a 40 dias para a forma mucosa. Em ambos os casos, os intervalos entre as doses não podem ser superiores a 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.

Ainda, de acordo com o manual do MS, falha terapêutica é caracterizada por ausência de remissão clínica após dois esquemas terapêuticos regulares. Recidiva é definida pelo reaparecimento de lesão, em qualquer parte do corpo, no período de até um ano após a cura clínica da lesão primária. A recidiva pode estar ligada ao estado imune do paciente e à forma clínica da doença. No entanto, em áreas endêmicas, a distinção entre recidiva e reinfecção nem sempre é uma tarefa simples, havendo a necessidade de estudos genéticos e identificação de subpopulações de parasitas circulantes na área. O abandono é caracterizado pelo não comparecimento na consulta de avaliação, três meses após o término do tratamento, independente da sua regularidade.

1.4.4. Definições relacionadas aos esquemas terapêuticos e critérios de cura adotados pelo Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (Vigileish/ IPEC/ FIOCRUZ)

No Vigileish, os critérios relacionados aos esquemas terapêuticos e à cura não são os mesmos adotados pelo MS (Romero et al., 2005).

O critério de cura é caracterizado pela progressão contínua para cicatrização da lesão cutânea após o início do tratamento, caracterizada por epitelização inicial e posterior desaparecimento de crostas, descamação, infiltração e eritema, nesta ordem, e pelo não surgimento de lesões mucosas.

O efeito terapêutico dos fármacos é avaliado da seguinte forma:

a) Resposta terapêutica inicial: presença ou ausência de epitelização total de todas as lesões até 3 meses após o término do tratamento. Na prática, lesões acima dos joelhos costumam estar epitelizadas ao final do tratamento ou, até 15 dias após a sua conclusão. Lesões abaixo dos joelhos costumam epitelizar após o término do tratamento, sendo que lesões de maior diâmetro e com insuficiência venosa associada podem necessitar de até 3 ou 4 meses para epitelizar.

b) Resposta terapêutica tardia: presença ou ausência dos seguintes elementos na progressão esperada para cicatrização total:

- Desaparecimento de crostas aproximadamente até um mês após a epitelização;
- Desaparecimento de descamação (superfície lisa) aproximadamente até 3 meses após a epitelização;
- Desaparecimento de infiltração aproximadamente até 6 meses após a epitelização;
- Desaparecimento de eritema aproximadamente até 9 meses após a epitelização;
- Não reaparecimento de qualquer estágio anterior ao alcançado, mantida em 2 observações realizadas com intervalo de pelo menos duas semanas;
- Não surgimento de lesão mucosa, até 5 anos após o tratamento da lesão cutânea.

c) Falha terapêutica: é caracterizada pela ausência de resposta a um esquema terapêutico, considerando os eventos descritos acima; quando houver o reaparecimento de qualquer estágio anterior ao alcançado, mantido em duas observações realizadas com intervalo de pelo menos duas semanas; e surgimento de lesão mucosa.

d) Reativação: caracterizada pelo reaparecimento da lesão, independente do tempo de cura clínica.

1.4.5. Mecanismos de ação do antimonial pentavalente

A estrutura molecular, o metabolismo e os mecanismos de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não são totalmente esclarecidos, embora estudos nestas áreas tentem elucidá-los (FRÉZARD et al., 2009).

Sabe-se que são medicamentos leishmanicidas, pois interferem na bioenergética de formas amastigotas de *Leishmania*. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, processos localizados em organelas peculiares, são inibidos, sendo tal inibição acompanhada de redução na produção de ATP e GTP. Além disso, ocorre a inibição da síntese de nucleosídeos de purina e de macromoléculas (OUELLETE & PAPADOPOULOU, 1993; BERMAN et al., 1985).

A ação dos antimoniais orgânicos contra protozoários pode envolver a ligação do antimônio a grupos sulfidrila do parasita, podendo ser este o maior mecanismo de ação e/ou de toxicidade (ROBERTS et al., 1995).

Alguns estudos sugerem que o antimonial pentavalente possa atuar como um pró-fármaco que no novo sítio de ação é convertido por enzimas redutases em antimônio trivalente, a forma mais tóxica e mais potente. Outros trabalhos sustentam a ação direta do antimonial pentavalente no parasita (FRÉZARD et al., 2009).

A estrutura molecular dos antimoniais permaneceu desconhecida por décadas. Com o uso da técnica de espectrometria de massa (FAB-MS) foi possível sugerir que o antimoniato de meglumina possui uma estrutura principal na qual duas moléculas de meglumina ligam-se a um único átomo de Sb em uma geometria simétrica (FRÉZARD et al., 2009).

As razões específicas para a não resposta ao tratamento antimonial ainda não foram totalmente esclarecidas (MARSDEN et al., 1985; BERMAN 1982,

1988). É possível que a variabilidade na resposta terapêutica esteja relacionada à sensibilidade do parasito ao antimônio, à imunidade do hospedeiro ou à farmacocinética do medicamento.

O mecanismo de resistência de *Leishmania* aos antimoniais também não está totalmente esclarecido. Algumas amostras de *Leishmania* são naturalmente menos sensíveis a ação do antimônio pentavalente que outras amostras, podendo haver uma resistência moderada ao antimônio na natureza (GROGL et al., 1992). A variabilidade da sensibilidade de *Leishmania* aos antimoniais vem sendo avaliada. Parasitos do gênero *Leishmania* recém-isolados de pacientes constituem uma população heterogênea. Clones de um mesmo isolado apresentam diferenças entre si quanto à suscetibilidade ao antimonial *in vitro* (GROGL et al., 1989).

1.5. Ensaio *in vitro* de sensibilidade aos fármacos

Estudos da atividade de agentes leishmanicidas têm sido realizados tanto *in vivo*, em animais infectados experimentalmente, quanto *in vitro*, utilizando formas amastigotas em culturas de células de mamíferos ou formas promastigotas em culturas axênicas (FUMAROLA et al., 2004).

Muitos ensaios *in vitro* têm sido desenvolvidos para testar a suscetibilidade de amostras de *Leishmania* a novos fármacos, tanto de formas amastigotas quanto de formas promastigotas. Além das diferenças morfológicas entre formas promastigotas e amastigotas, diferenças bioquímicas podem explicar em parte as diferenças de suscetibilidade aos fármacos encontradas nestes dois estágios (FUMAROLA et al., 2004).

A sensibilidade de formas amastigotas intracelulares de macrófagos comparada à das formas promastigotas em meio axênico sugere que as amastigotas sejam inerentemente mais sensíveis a este fármaco. Alternativamente o macrófago pode concentrar o fármaco ativo no fagolisossomo que abriga o parasito. Outra possibilidade seria a de que o macrófago humano possa metabolizar o fármaco para a forma com maior atividade leishmanicida (BERMAN & WYLER, 1980).

Berman e Wyler 1980 avaliaram a sensibilidade de formas amastigotas de *L. tropica* e de *L. donovani* em macrófagos derivados de monócitos humanos, frente ao antimônio pentavalente (estibogluconato de sódio),

pentamidina e anfotericina B. A dosagem dos fármacos *in vitro* foi calculada através da concentração menor ou igual aos níveis séricos encontrados em pacientes tratados com estes agentes. Em torno de 90% de amastigotas foram eliminadas no interior das células, tendo a anfotericina B demonstrado melhor ação na morte parasitária. Estes resultados foram comparáveis com o modelo *in vivo* (BERMAN & WYLER, 1980).

Ensaio com formas amastigotas também podem ser realizados em culturas axênicas, os quais permitem a triagem do fármaco no estágio do parasita clinicamente relevante, sem a necessidade do uso de cultura de células (CALLAHAN et al., 1997).

No intestino médio do vetor flebotomíneo, promastigotas flageladas multiplicam-se e depois sofrem modificações gerando as formas metacíclicas, as quais são indivisíveis e infectantes para os macrófagos dos mamíferos. Este desenvolvimento sequencial também foi demonstrado em cultura: promastigotas das culturas em fase logarítmica de crescimento são essencialmente avirulentas, enquanto as culturas em fase estacionária contêm promastigotas infectivas, as quais apresentam características similares às formas metacíclicas encontradas no vetor. Portanto, os testes de inibição de crescimento têm sido realizados geralmente com as formas iniciais de promastigotas metacíclicas (SACKS & PERKINS, 1984). Daí, a necessidade de determinação da curva de crescimento de cada amostra de *Leishmania* utilizada nos ensaios *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a sensibilidade *in vitro* ao antimoniato de meglumina de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* obtidas antes e após o tratamento de pacientes com falha terapêutica ou reativação das lesões cutâneas.

2.2. Específicos

- Estabelecer o perfil de crescimento das formas promastigotas dos pares de amostras selecionadas para o estudo;
- Avaliar a sensibilidade de formas promastigotas a diferentes concentrações do antimoniato de meglumina, estabelecendo a DL₅₀ dos isolados obtidos antes e após a terapêutica;
- Avaliar a sensibilidade de formas amastigotas a diferentes concentrações do antimoniato de meglumina, estabelecendo a DL₅₀ dos isolados obtidos antes e após a terapêutica;
- Comparar a sensibilidade ao antimoniato de meglumina obtida *in vitro* de ambas as formas evolutivas do parasita, considerando as amostras isoladas antes e após a terapêutica;
- Correlacionar os resultados obtidos *in vitro* com a resposta clínica do paciente aos esquemas terapêuticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento do estudo

Este estudo avaliou a sensibilidade *in vitro* de amostras pareadas de *L. braziliensis* ao antimoniato de meglumina (Glucantime®). Foram comparados pares de amostras isoladas de pacientes atendidos no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (VigiLeish) do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ). Cada par foi constituído por amostras isoladas, respectivamente, antes do tratamento e após falha terapêutica ou reativação das lesões pós-tratamento. Nos ensaios *in vitro*, empregaram-se formas promastigotas e amastigotas, expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina, visando estabelecer a DL₅₀ para cada forma.

3.2. Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo CEP/IPEC em 25/10/10 sob o protocolo 0050.0.009.000-10 e sob responsabilidade da Dra. Maria de Fátima Madeira (Anexo A).

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

3.3. Critério de seleção dos pacientes e amostras

Os critérios de seleção dos pacientes e amostras estudados foram:

- Pacientes que apresentavam a forma cutânea da LTA;
- Pacientes submetidos ao tratamento com antimoniato de meglumina, independente do esquema terapêutico empregado;
- Pacientes que apresentaram falha terapêutica ou reativação das lesões cutâneas;

- Pacientes que possuíam duas amostras isoladas no pré e no pós-tratamento, ambas estocadas no banco de amostras do Laboratório Vigileish;
- Pacientes cujas duas amostras tenham sido previamente identificadas pela técnica de isoenzimas como *L. braziliensis*.

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 primeiro esquema terapêutico, ao se constatar falha terapêutica ou reativação das lesões cutâneas.

As amostras estudadas foram recuperadas do nitrogênio líquido e novamente criopreservadas em lotes até a 5ª passagem (repiques), visando manter a infectividade da amostra. Inicialmente foi feita uma expansão parasitária para obtenção de 15 a 20 mL de cultura em fase exponencial. O sedimento resultante da centrifugação (7000rpm/15 minutos) foi ressuspenso em 6,0 mL de “Freezing Solution” (meio BHI contendo 30% de SFB e 10% de glicerol) e, após homogeneização, a suspensão de parasitas foi transferida para criotubos com capacidade de 1,8 mL, e submetidos à refrigeração gradual: 1 hora à 4°C, 2 horas a - 20°C, 2 horas em gelo seco e, em seguida, os criotubos foram armazenados em caixas numeradas nos botijões de nitrogênio líquido (-196°C). Após 7 dias, um criotubo foi retirado do nitrogênio para avaliação da mobilidade e do crescimento dos parasitas em meio de cultura.

3.4. Curva de crescimento de formas promastigotas

Para realização dos ensaios propostos, foi necessário estabelecer a curva de crescimento de todas as amostras estudadas, para identificação da fase estacionária. As amostras foram retiradas do nitrogênio aos pares (**A** e **B**), semeadas, separadamente, em meio de cultura Schneider's contendo 10% de SFB e submetidas à temperatura de 26-28°C em estufa.

A curva de crescimento foi realizada em tubos de ensaio (16 x 150 mm) com tampa rosqueada, contendo 4 mL de meio Schneider's, suplementado com 10% de SFB e adição de antibióticos (200U de penicilina + 100µg de estreptomicina) sendo iniciada com 1×10^7 parasitas/mL e submetidos a temperatura de 26-28°C. Para estimar o crescimento, procedeu-se a quantificação de células em câmara de Neubauer empregando o corante azul de Trypan (0,1% em PBS) em intervalos de 24 horas, durante 4 ou 5 dias. A quantificação de células foi realizada em triplicata. O número final de parasitas por mililitro de meio de cultura foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de parasitas/mL} = \text{Média aritmética de três contagens} \times 10^4 \text{ (fator de correção da câmara de Neubauer)} \times \text{diluição utilizada}$$

3.5. Ensaios de avaliação da sensibilidade ao antimonial pentavalente

A sensibilidade ao antimonial pentavalente foi avaliada em todos os pares de isolados (amostras **A** e **B**), utilizando formas promastigotas e amastigotas. Foram avaliadas diferentes concentrações do antimoniato de meglumina em ambas as formas do parasita. Utilizou-se antimoniato de meglumina (Glucantime®, Sanofis-Aventis) disponível em ampolas de 5mL, contendo 81mgSb^V/mL e obtido junto ao setor farmacêutico do IPEC. O antimoniato de meglumina foi estocado a temperatura ambiente e utilizado diluído em meio de cultura Schneider's (Sigma) ou RPMI-1640 (Gibco), sendo empregado em todos os ensaios o mesmo lote de Glucantime® (Lote 604898).

3.5.1. Ensaio com formas promastigotas

Os parasitas foram utilizados na fase estacionária estabelecida após a curva de crescimento mencionada no item 3.4.

Os ensaios foram realizados em placas para cultura de 96 poços com fundo em U, 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 µL da suspensão contendo 1×10^6 parasitas, diluídos em meio Schneider, foram colocados nos poços da placa, em triplicatas, contendo o mesmo volume de fármaco (100µL). Foram empregadas

diluições seriadas ao dobro de antimoniato de meglumina, iniciando na concentração de 8,1 mg/mL até 3,955 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^{V} (Figura 2). As placas foram incubadas em estufa biológica (26-28°C), e após 24 horas e 48 horas, os parasitas 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 dos ensaios. Os valores obtidos a partir da contagem, em triplicata, 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 e a DL_{50} foi determinada a partir do gráfico, cuja concentração do fármaco determinou 50% de letalidade aos parasitas (MACHADO et al., 2007).

Abaixo apresentamos o esquema da placa utilizada para os ensaios com formas promastigotas.

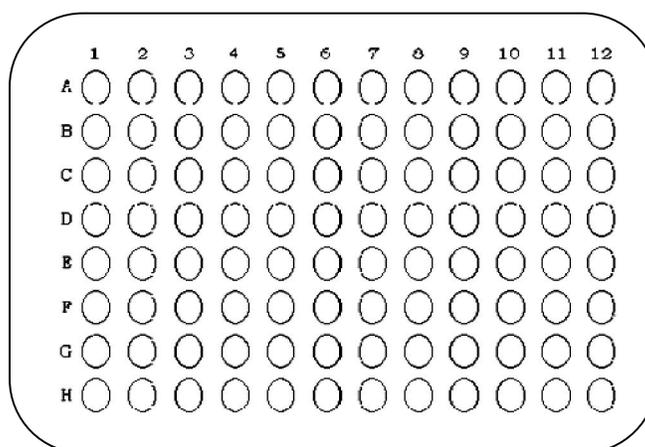


Figura 2: Esquema da placa de cultura de 96 poços onde foram avaliadas as amostras A e B expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina.

A diluição do antimoniato de meglumina ao dobro foi iniciada com 8,1 mg/mL (coluna 1) até 3,955 $\mu\text{g/mL}$ (coluna 12).

Linhas A, B e C = Amostra A exposta às diferentes concentrações de antimoniato de meglumina.

Linhas D, E e F = Amostra B exposta às diferentes concentrações de antimoniato de meglumina.

Linha H (1, 2 e 3) = Controle Amostra A (cultura sem adição de antimoniato de meglumina).

Linha H (7, 8 e 9) = Controle Amostra B (cultura sem adição de antimoniato de meglumina).

3.5.2. Ensaio com formas amastigotas

3.5.2.1. Coleta e plaqueamento de macrófagos murinos

Os macrófagos foram obtidos por lavagens da cavidade peritoneal de sete camundongos adultos Swiss Webster (outbred) com meio RPMI-1640 (GIBCO®). Após a eutanásia em câmara de CO₂, os camundongos foram presos, em decúbito dorsal, em suporte de cortiça, para a assepsia da região abdominal com álcool etílico 70%. Com o auxílio de duas pinças do tipo “dente de rato”, a pele do animal foi cortada e o peritônio exposto. Cerca de 8 mL de meio de cultura RPMI foram introduzidos na cavidade peritoneal, utilizando seringa e agulha estéreis. Após suave massagem nessa região, o meio introduzido foi aspirado com a mesma seringa, sendo imediatamente acondicionado em gelo. O volume final foi quantificado e a concentração ajustada para 2×10^6 macrófagos/mL. Para a quantificação foi empregado o corante vital azul de Trypan na concentração de 0,1mg em PBS, visando excluir células danificadas. Após ajuste de concentração, 200µL da suspensão de células foram colocados em cada um dos compartimentos da lâmina para cultura de células (Lab-Tec®) contendo oito poços individualizados. As lâminas foram incubadas em estufa a 37°C em ambiente de CO₂ (5%) por duas horas. Após esse período, as células não aderentes foram retiradas por esquemas de suaves lavagens empregando meio RPMI pré-aquecido (37°C). Em seguida, foram adicionados 200 µL de meio RPMI acrescidos de 10% de SFB, retornando as lâminas para a estufa de CO₂.

3.5.2.2. Infecção dos macrófagos

Após 24 horas do plaqueamento, as lâminas foram examinadas em microscópio invertido para avaliar a aderência das células e se houve alguma contaminação. Formas promastigotas das amostras **A** e **B**, em fase estacionária, repicadas anteriormente, foram lavadas em meio RPMI e ajustadas para a concentração de 5 a 10 parasitas por macrófago e colocadas em contato com a camada dessas células aderidas às lâminas, em volume de cerca de 200µL por cada poço. As lâminas foram incubadas por duas horas nas mesmas condições anteriores. Após esse período, os parasitas não

interiorizados foram retirados por esquemas de lavagem. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de meio RPMI contendo 5% de SFB. Finalmente, nova incubação por 24 horas em estufa a 37°C em ambiente de CO₂ (5%).

3.5.2.3. Exposição ao antimoniato de meglumina

Inicialmente, as lâminas foram analisadas em microscópio invertido para verificar a adesão das células. O antimoniato de meglumina foi incorporado após 24 horas da infecção nas concentrações de 20, 40 e 80 μ g Sb^V/mL, diluído em meio RPMI-1640 (GIBCO®) e renovado diariamente. A cinética de infecção foi avaliada nos intervalos de 0, 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 ao fármaco.

O ponto 0 (zero) indica o momento imediatamente anterior à introdução do fármaco. Os controles foram macrófagos infectados com as amostras **A** e **B**, respectivamente, sem exposição ao fármaco.

O efeito das diferentes concentrações de antimoniato de meglumina foi determinado para as amostras **A** e **B** e seus respectivos controles, através da contagem aleatória dos macrófagos em cada um dos intervalos, em microscópio óptico. Foram quantificadas 100 células em cada experimento, sendo o resultado expresso pela média obtida de dois experimentos. Dois parâmetros foram considerados: percentual (%) de células infectadas e número médio de amastigotas por célula, cujos gráficos foram realizados com ajuda do programa Microsoft Office Excel (versão 2007). De posse desses valores, foi estabelecido o Índice de Infecção para o ponto de 48 horas, calculado segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Índice de Infecção} = \frac{\% \text{ de macrófagos infectados} \times \text{n}^{\circ} \text{ médio de amastigotas intracelulares}}{100}$$

A dose do fármaco necessária para a letalidade de 50% dos parasitas (DL₅₀) para formas amastigotas foi 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.

4. RESULTADOS

4.1. Pacientes e amostras selecionadas para o estudo

Foram estudados sete pares de amostras de *L. braziliensis* isoladas de sete pacientes com LC, respectivamente, antes do tratamento e após falha terapêutica ou reativação. Eram 4 mulheres e 3 homens, com idades entre 18 e 71 anos. Seis pacientes apresentavam uma ou duas lesões, enquanto um apresentava 5 lesões. O período de evolução da doença até o primeiro isolamento (obtenção da amostra **A**) variou de 1,5 a 18 meses. Todos foram tratados com antimoniato de meglumina no primeiro esquema terapêutico: cinco receberam 5mg Sb^V/Kg/dia IM e dois receberam tratamento por via intralesional. Falha terapêutica foi observada em quatro pacientes e reativação em três. O intervalo entre isolamento da amostra **A** e amostra **B** variou de 7 (paciente 4) a 27 meses (paciente 6).

Quanto ao desfecho: um paciente abandonou o tratamento; dois curaram com o mesmo esquema empregado inicialmente; e quatro pacientes curaram com Anfotericina B ministrada após o 2º ou 3º esquema terapêutico.

Dados dos pacientes relacionados à clínica e aos esquemas terapêuticos empregados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Dados dos sete pacientes com leishmaniose cutânea, cujos pares de amostras de *Leishmania braziliensis* foram isolados antes do tratamento e após falha terapêutica ou reativação das lesões.

| Iniciais e Nº do paciente | Idade / Sexo | Tempo de Evolução (meses) | Nº de lesões | 1º Esquema terapêutico/Desfecho | Intervalo entre 1º e 2º isolamento (meses) | Outros esquemas terapêuticos e desfecho final |
|---------------------------|--------------|---------------------------|--------------|--|--|--|
| AES - 1 | 65/M | 18 | 1 | 5mg Sb ^V em série – 30 doses/ Falha terapêutica | 21 | 2º tto: 5mg Sb ^V em série 3º tto: IL 4º tto: Anf B - Cura |
| ALS - 2 | 37/F | 3 | 1 | IL - 2 doses/ Reativação | 13 | 2º tto: IL 3º tto: Anf B – Cura |
| ILC - 3 | 59/M | 1,5 | 5 | 5mg Sb ^V em série - 30 doses/ Falha terapêutica | 14 | 2º tto: 5mg Sb ^V contínuo 3º tto: 5mg Sb ^V contínuo - Cura |
| DSC - 4 | 18/F | 2 | 2 | 5mg Sb ^V contínuo - 30 doses/ Falha terapêutica | 07 | 2º tto: 5mg Sb ^V contínuo 3º tto: 20mg + Pentoxifilina Engravidou e abandonou |
| TSA - 5 | 21/F | 1,5 | 1 | 5mg Sb ^V contínuo - 38 doses/ Falha terapêutica | 18 | 2º tto: IL 3º tto: Anf B – Cura |
| ECR - 6 | 42/F | Ignorado | 1 | 5mg Sb ^V contínuo - 45 doses/ Reativação | 27 | 2º tto: 5mg Sb ^V série 3º tto: 5mg contínuo – Cura |
| DCA - 7 | 71/M | 1,5 | 1 | IL - 8 doses/ Reativação | 13 | 2º tto: IL 3º tto: Anf B – Cura |

Tto (tratamento); IL (esquema intralesional); Anf B (Anfotericina B); F (feminino); M (masculino).

4.2. Curva de crescimento

A curva de crescimento foi realizada para todas as 14 amostras selecionadas (**A** e **B**), sendo tal crescimento estimado por contagem do número de células/mL em intervalos de 24 horas. Em geral, as amostras apresentaram uma fase exponencial de crescimento (fase log) entre 1 e 3 dias, enquanto a fase estacionária variou entre 3 e 4 dias. Embora o perfil da curva de crescimento tenha sido semelhante para quase todos os pares de isolados (amostras **A** e **B**), observou-se um número médio de parasitas maior para o primeiro isolado (amostras **A**) que para o segundo isolado (amostras **B**) em todos os pontos da curva de crescimento, exceto para a curva da paciente nº 6. Em todos os experimentos com formas promastigotas, optou-se por utilizar os parasitas no 3º dia do crescimento.

Os gráficos que representam as curvas de crescimento de cada amostra estudada são apresentados na figura 3. Os valores expressam a média de três determinações.

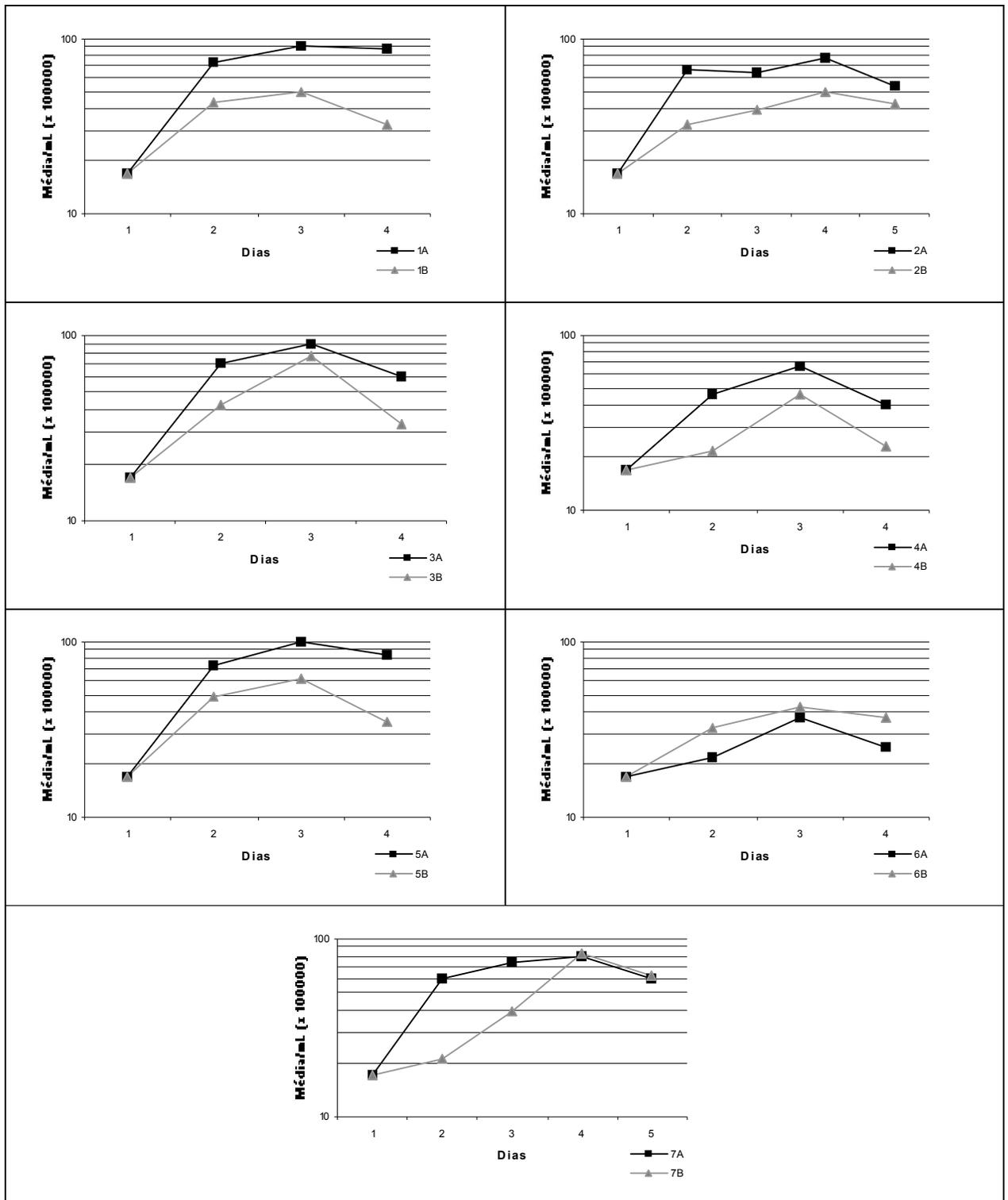


Figura 3: Perfil da curva de crescimento das formas promastigotas de *L. braziliensis* isoladas de sete pacientes com LC. Amostra A obtida no momento do diagnóstico, antes do tratamento, e amostra B obtida após tratamento com antimoníato de meglumina de pacientes com falha terapêutica ou reativação das lesões cutâneas.

4.3. Avaliação da sensibilidade ao antimônio pentavalente

4.3.1. Formas promastigotas

A ação do antimônio de meglumina foi expressa em DL₅₀ (mg/mL), indicando a concentração de Sb^V necessária para inibição de 50% do crescimento de formas promastigotas em 24 e 48 horas. Nesses ensaios, a DL₅₀ variou de 0,37 a 5,86 mg/Sb^V/mL para as amostras **A** e de 0,89 a 7,80 mg/Sb^V/mL para as amostras **B** em 24 horas de exposição ao antimônio de meglumina. Em 48 horas de exposição, os valores de DL₅₀ variaram de 0,37 a 5,75 mg/Sb^V/mL para as amostras **A** e de 0,7 a 7,68 mg/Sb^V/mL para as amostras **B**.

Em seis pares de amostras, a DL₅₀ obtida para as amostras **B** (isolada após falha terapêutica ou reativação) apresentou valores mais elevados em relação às amostras **A** (isoladas antes do tratamento) em ambos os pontos de 24 e 48 horas de exposição. Entretanto, a amostra **A** do paciente nº 2 apresentou menor sensibilidade que a respectiva amostra **B**, em ambos os tempos de exposição.

As concentrações de Sb^V, expressas em DL₅₀ (mg/mL) para as amostras **A** e **B**, sob a forma promastigota estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3: Valores de DL₅₀ (mg/mL) com desvio padrão obtidos para formas promastigotas das amostras A e B de *Leishmania braziliensis* avaliadas nos intervalos de 24 e 48 horas de exposição a diferentes concentrações de antimônio de meglumina.

| Paciente | Amostra A | | Amostra B | |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | DL ₅₀ (mg/mL) | DL ₅₀ (mg/mL) | DL ₅₀ (mg/mL) | DL ₅₀ (mg/mL) |
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| 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 ± 0,004 | 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 |

Nas figuras de nº 4 a 10 são apresentados os gráficos relacionados à curva do percentual de inibição para cada amostra, respectivamente em 24 e 48 horas de exposição.

A DL_{50} é indicada através do ponto de interseção da curva com o valor que indica 50% de inibição (eixo Y) com a respectiva concentração de antimoniato de meglumina (eixo X).

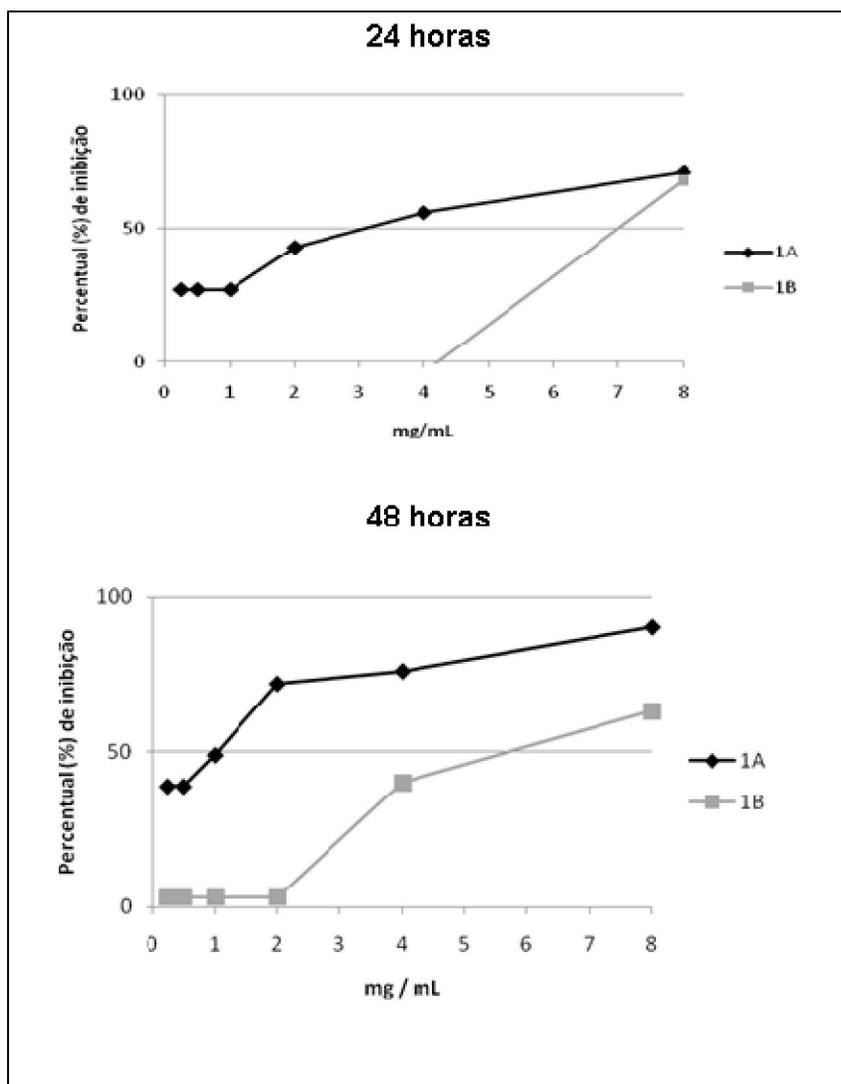


Figura 4: Identificação gráfica do percentual de inibição de formas promastigotas obtidas com as amostras A e B do paciente nº 1 (AES) expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina nos tempos de 24 e 48 horas.

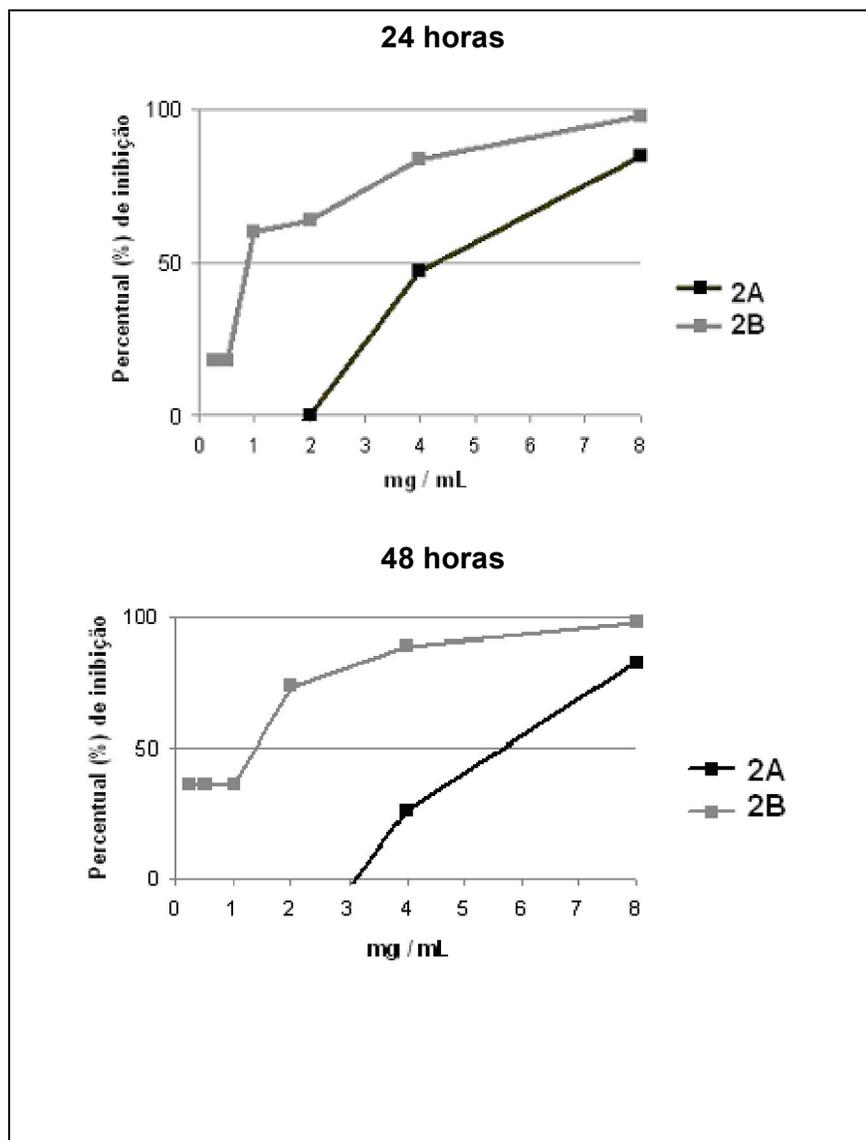


Figura 5: Identificação gráfica do percentual de inibição de formas promastigotas obtidas com as amostras A e B do paciente nº 2 (ALS) expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina nos tempos de 24 e 48 horas.

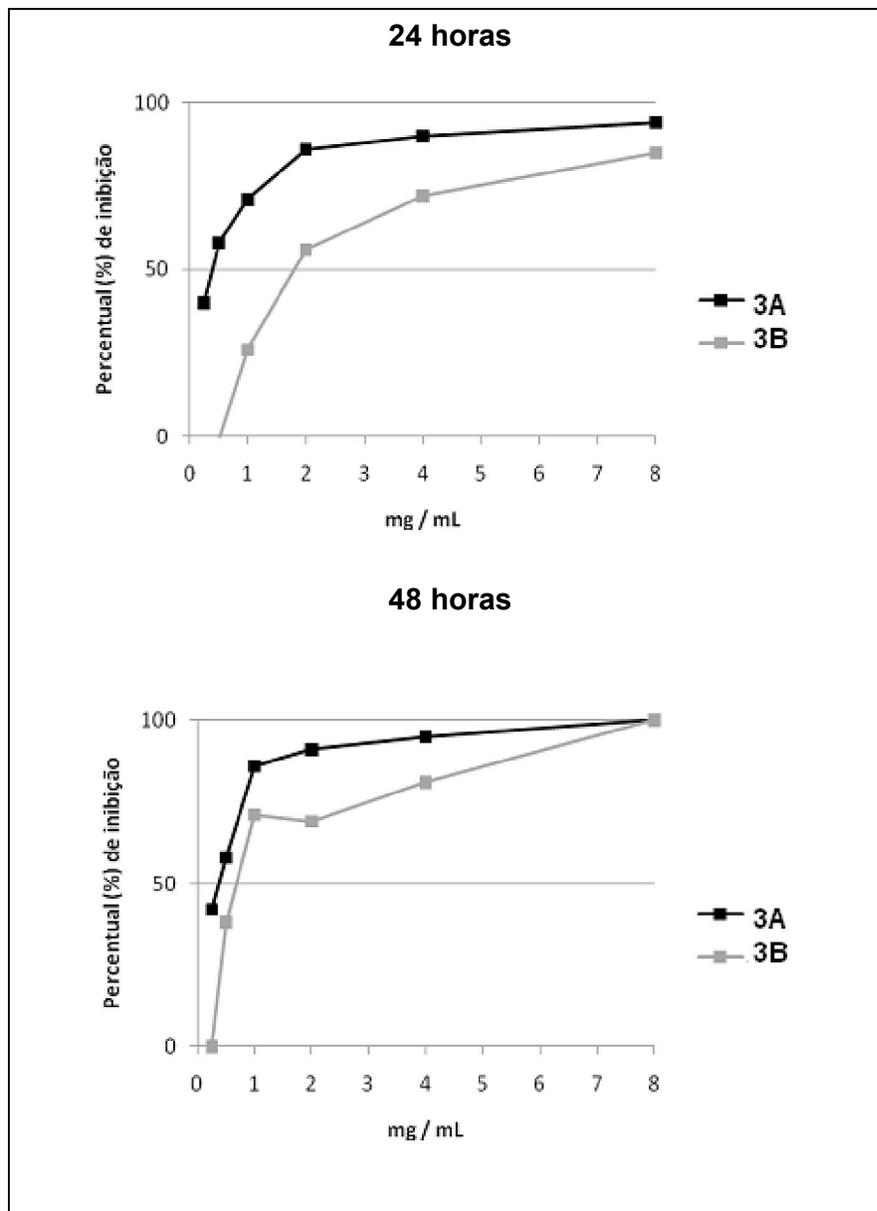


Figura 6: Identificação gráfica do percentual de inibição de formas promastigotas obtidas com as amostras A e B do paciente nº 3 (ILC) expostas a diferentes concentrações de antimoniate de meglumina nos tempos de 24 e 48 horas.

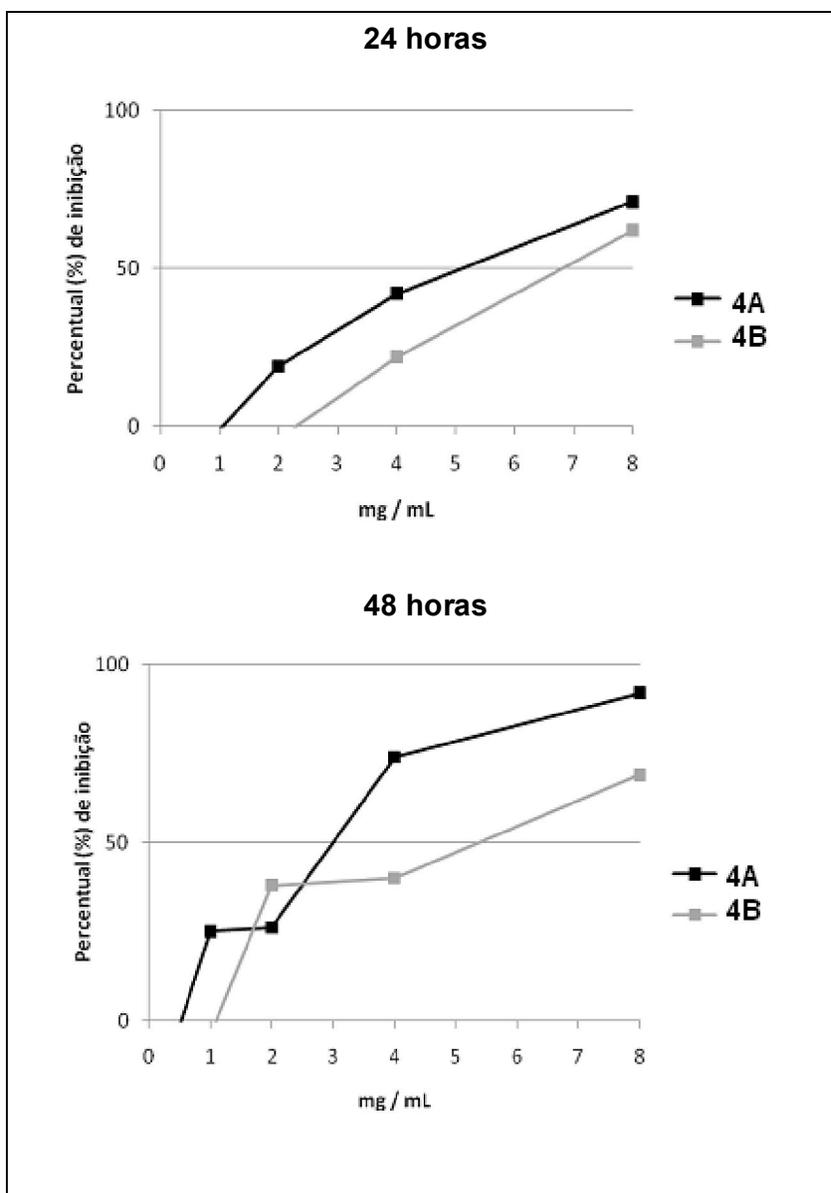


Figura 7: Identificação gráfica do percentual de inibição de formas promastigotas obtidas com as amostras A e B do paciente nº 4 (DSC) expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina nos tempos de 24 e 48 horas.

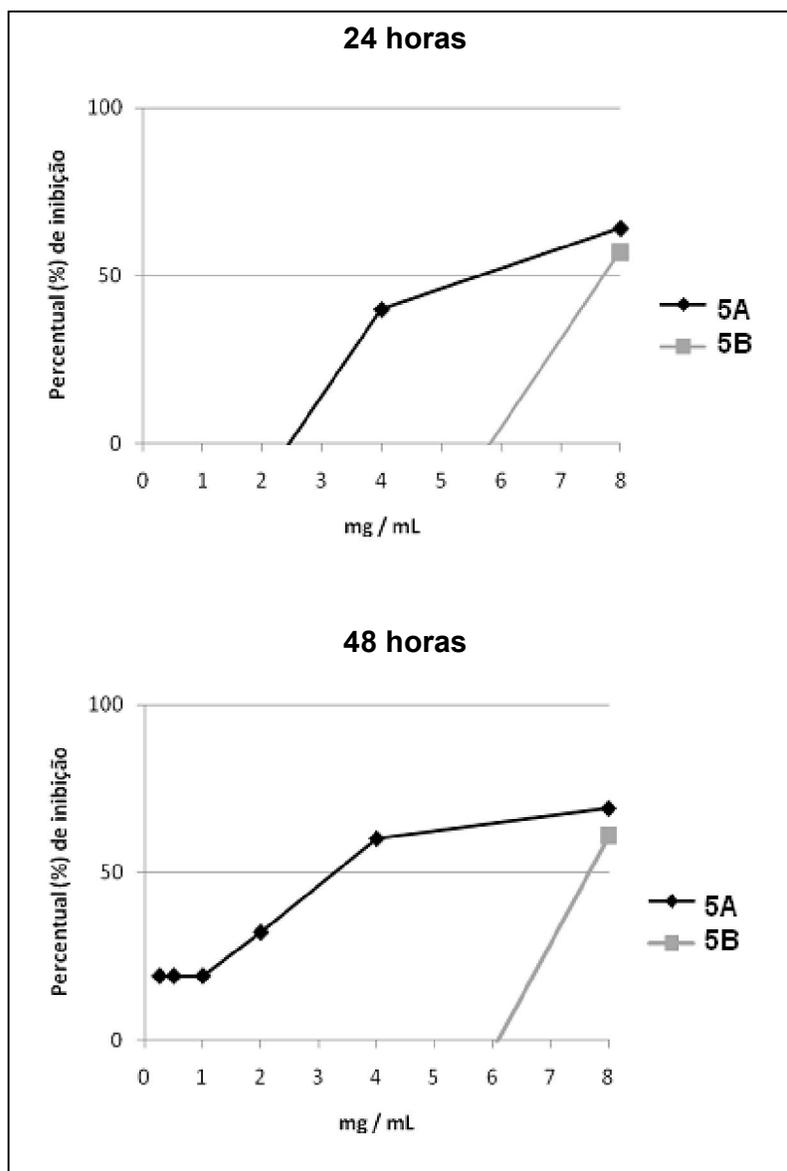


Figura 8: Identificação gráfica do percentual de inibição de formas promastigotas obtidas com as amostras A e B do paciente nº 5 (TSA) expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina nos tempos de 24 e 48 horas.

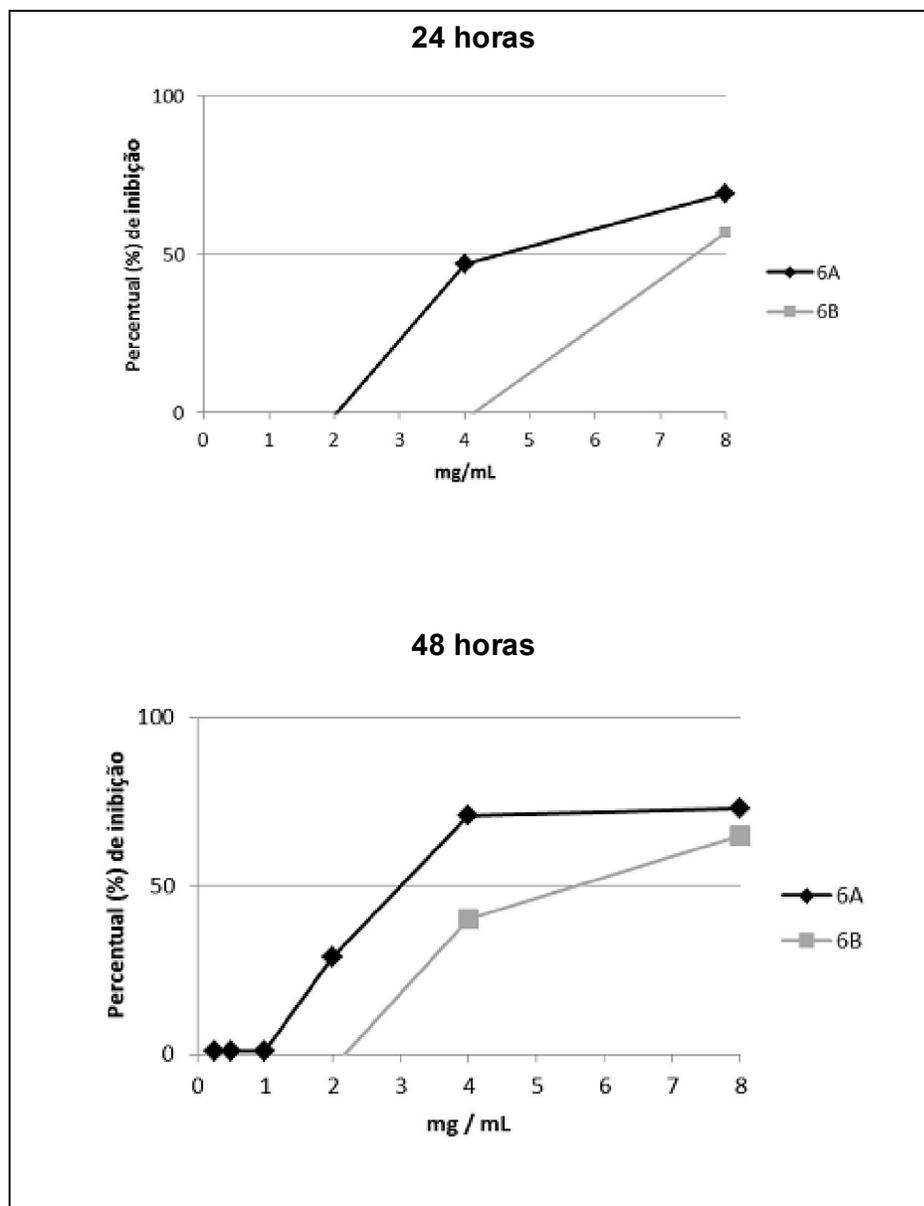


Figura 9: Identificação gráfica do percentual de inibição de formas promastigotas obtidas com as amostras A e B do paciente nº 6 (ECR) expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina nos tempos de 24 e 48 horas.

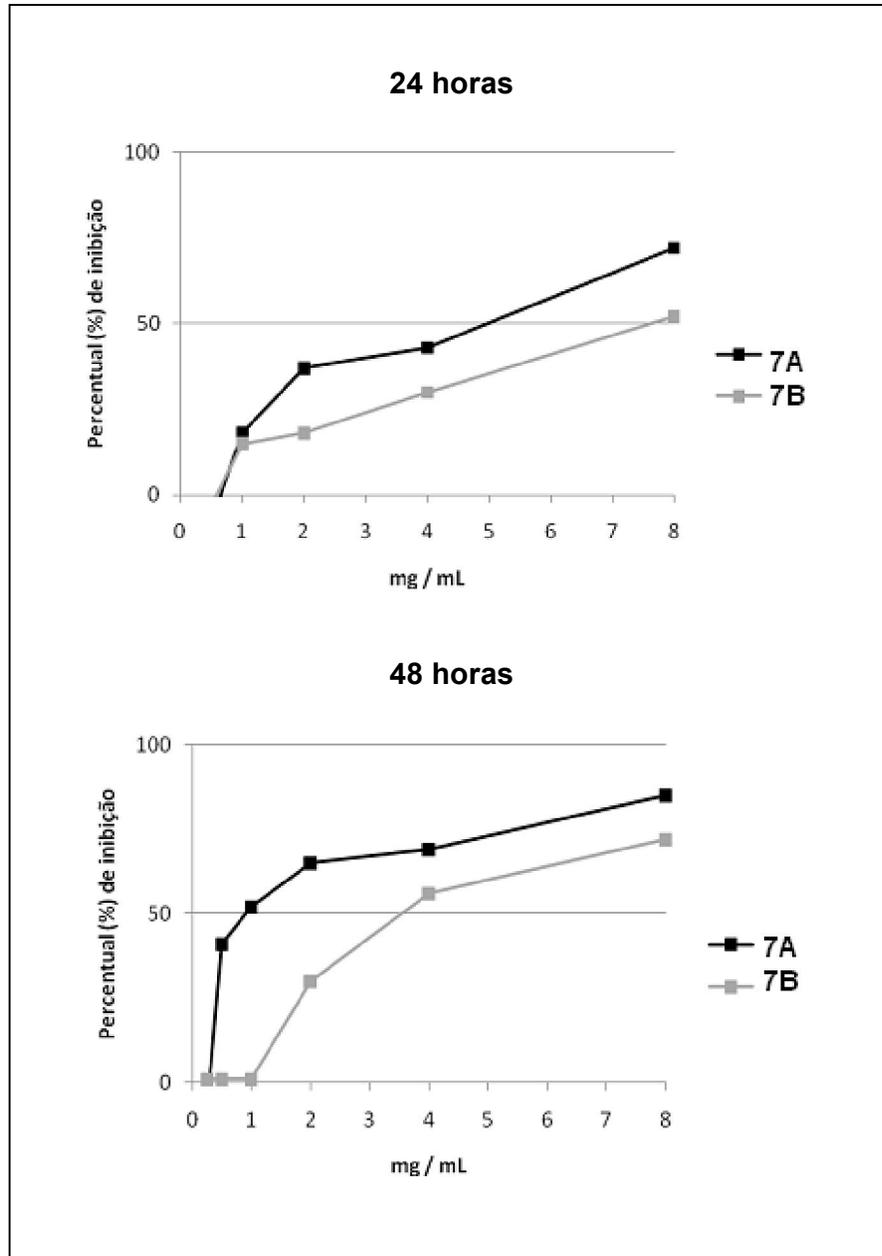


Figura 10: Identificação gráfica do percentual de inibição de formas promastigotas obtidas com as amostras A e B do paciente nº 7 (DCA) expostas a diferentes concentrações de antimoniato de meglumina nos tempos de 24 e 48 horas.

4.3.2. Formas amastigotas

As formas amastigotas dos sete pares de amostras foram testadas quanto à sensibilidade ao antimoniato de meglumina. As amostras **A** e **B** foram avaliadas no mesmo ensaio, sendo comparadas com seus respectivos controles. Na Figura 11 são apresentadas imagens representativas da cinética de infecção de macrófagos infectados com formas amastigotas, obtidas por microscopia ótica (1000x).

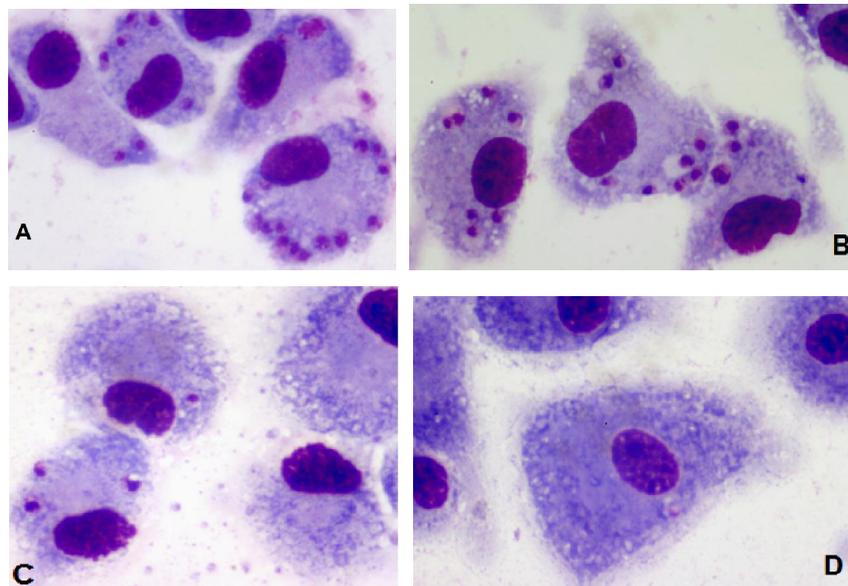


Figura 11: Macrófagos infectados com formas amastigotas de *L. braziliensis*. A. Controle (24 horas). B. Antimoniato de meglumina 40µg (24 horas). C. Antimoniato de meglumina 40µg (48 horas). D. Antimoniato de meglumina 40µg (72 horas).

- **Avaliação do percentual de infecção e do número médio de amastigotas intracelulares**

A taxa de infecção dos macrófagos para as diferentes amostras foi determinada pelo percentual de células infectadas e pelo número médio de amastigotas por macrófago.

Ambas as amostras controles de **A** e **B** (sem exposição ao antimoniato de meglumina) apresentaram percentual de infecção em torno de 90-100%, em toda a cinética de acompanhamento, com exceção das amostras do paciente nº 4 que demonstrou valores mais elevados desse parâmetro para a amostra **A**, em todos os pontos da cinética. Com relação ao número de amastigotas

intracelulares, observamos que nas amostras dos pacientes 1 e 7 tal parâmetro não variou muito de **A** para **B**, já para as amostras dos pacientes 2 e 4, **A** foi maior que **B**, e nos pacientes de nº 3, 5 e 6, **B** foi maior que **A**.

Por ambos os parâmetros de avaliação, todas as amostras (**A** e **B**) expostas ao antimoniato de meglumina apresentaram sensibilidade a partir de 24 ou 48 horas de exposição, independente da concentração utilizada. Ambas as amostras **A** e **B** apresentaram comportamento semelhante intra e interpacientes, por ambos os parâmetros avaliados.

Nas figuras 12 a 18 são apresentados os gráficos com os valores médios do percentual (%) de células infectadas (linhas) e do número de amastigotas intracelulares (colunas) avaliados durante toda a cinética de infecção para as diferentes concentrações de antimoniato de meglumina.

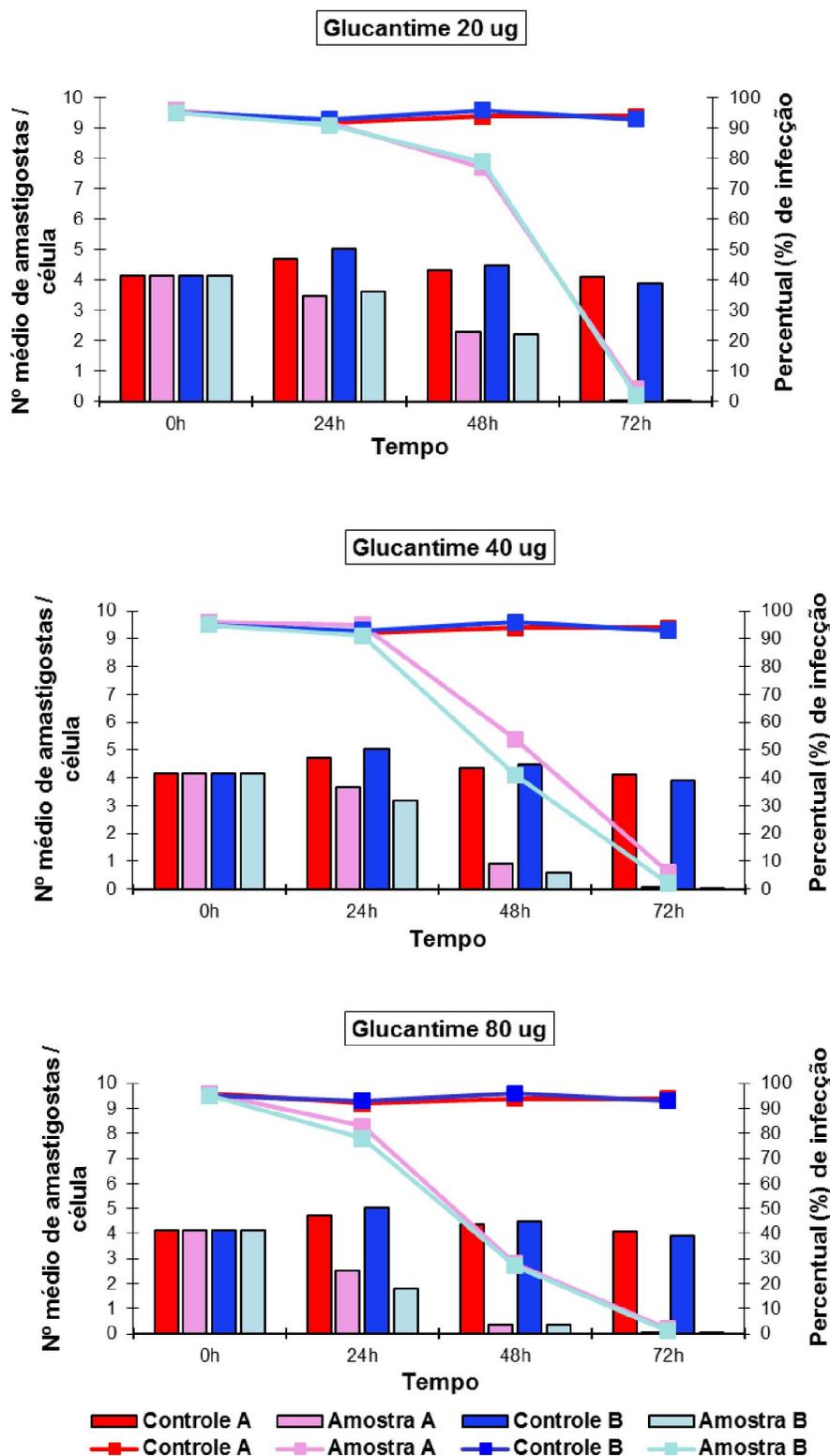


Figura 12: Percentual de células infectadas (linhas) e número médio de amastigotas intracelulares (colunas) das amostras A e B do paciente nº 1 e seus respectivos controles, quando expostos as concentrações de 20µg, 40µg e 80µg de antimoniato de meglumina.

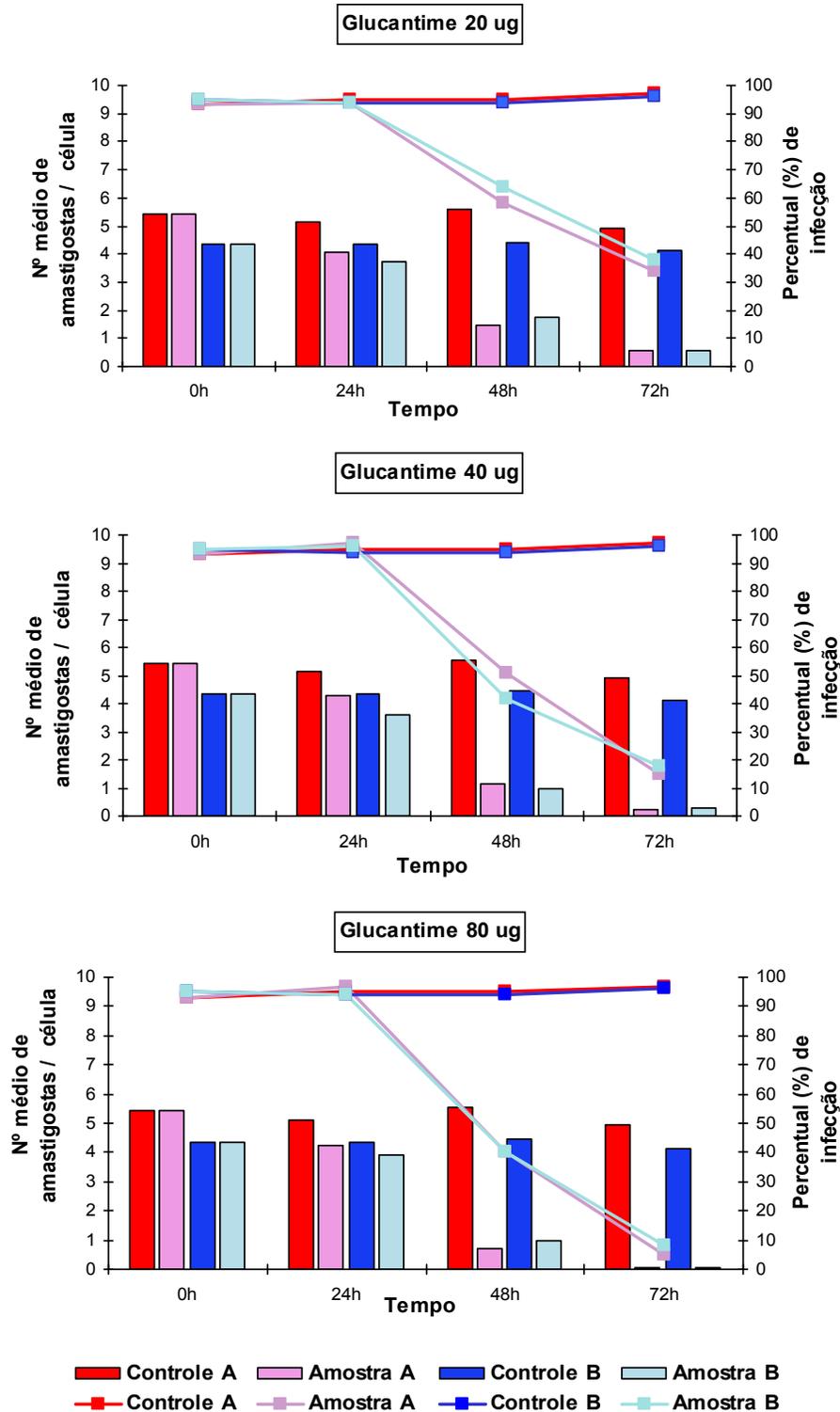


Figura 13: Percentual de células infectadas (linhas) e número médio de amastigotas intracelulares (colunas) das amostras A e B do paciente nº 2 e seus respectivos controles, quando expostos as concentrações de 20µg, 40µg e 80µg de antimoniato de meglumina.

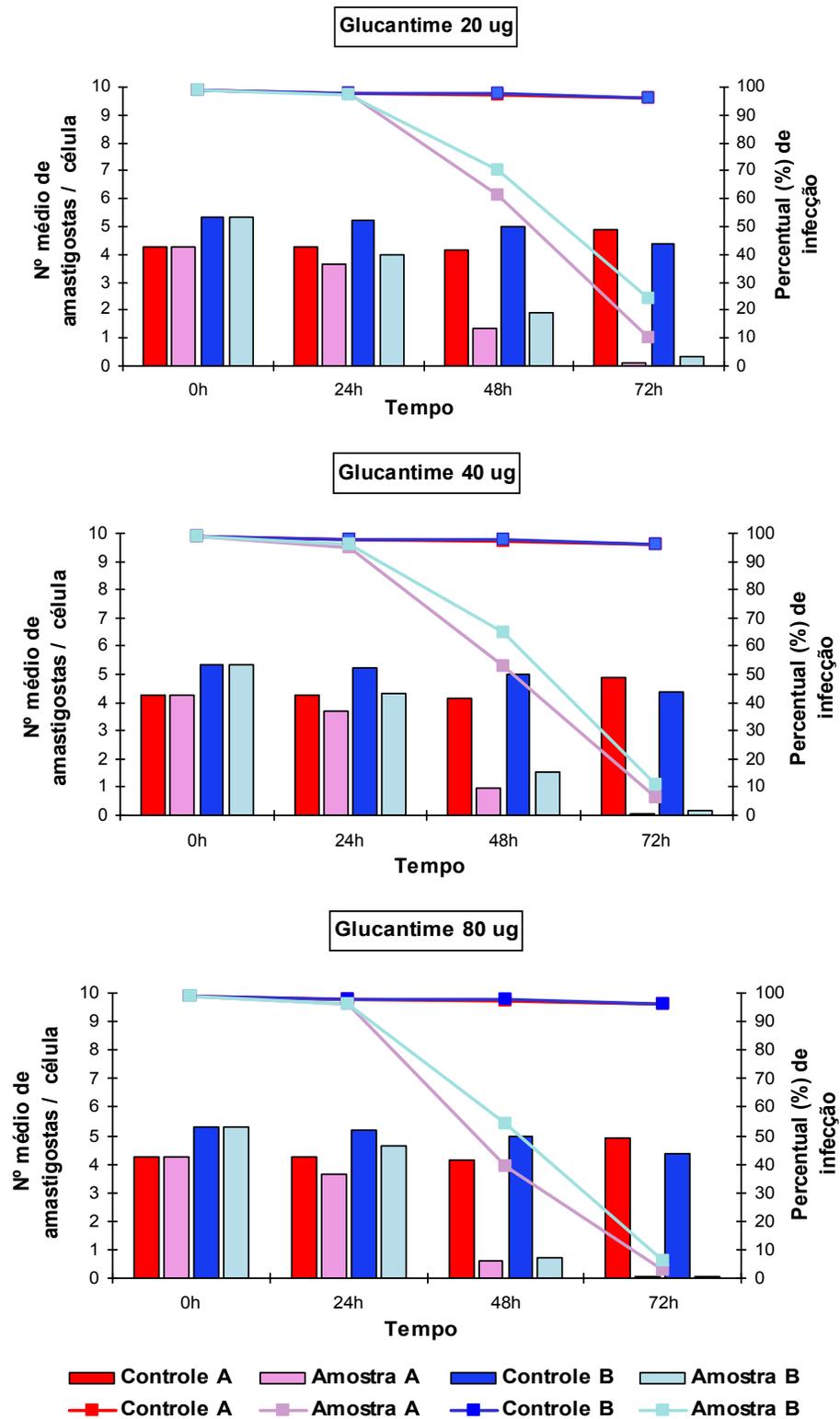


Figura 14: Percentual de células infectadas (linhas) e número médio de amastigotas intracelulares (colunas) das amostras A e B do paciente nº 3 e seus respectivos controles, quando expostos às concentrações de 20µg, 40µg e 80µg de antimoniato de meglumina.

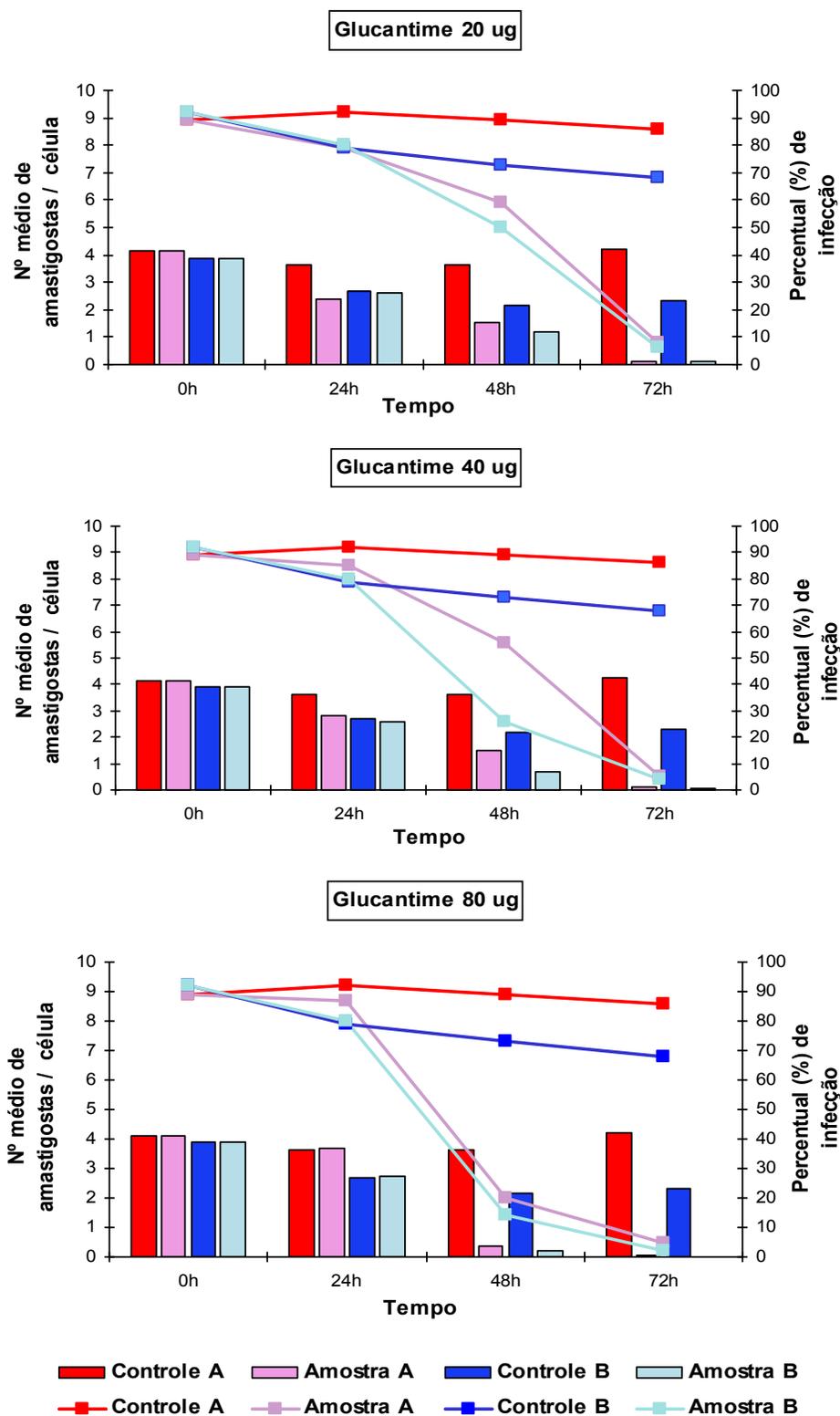


Figura 15: Percentual de células infectadas (linhas) e número médio de amastigotas intracelulares (colunas) das amostras A e B do paciente nº 4 e seus respectivos controles, quando expostos às concentrações de 20µg, 40µg e 80µg de antimoniato de meglumina.

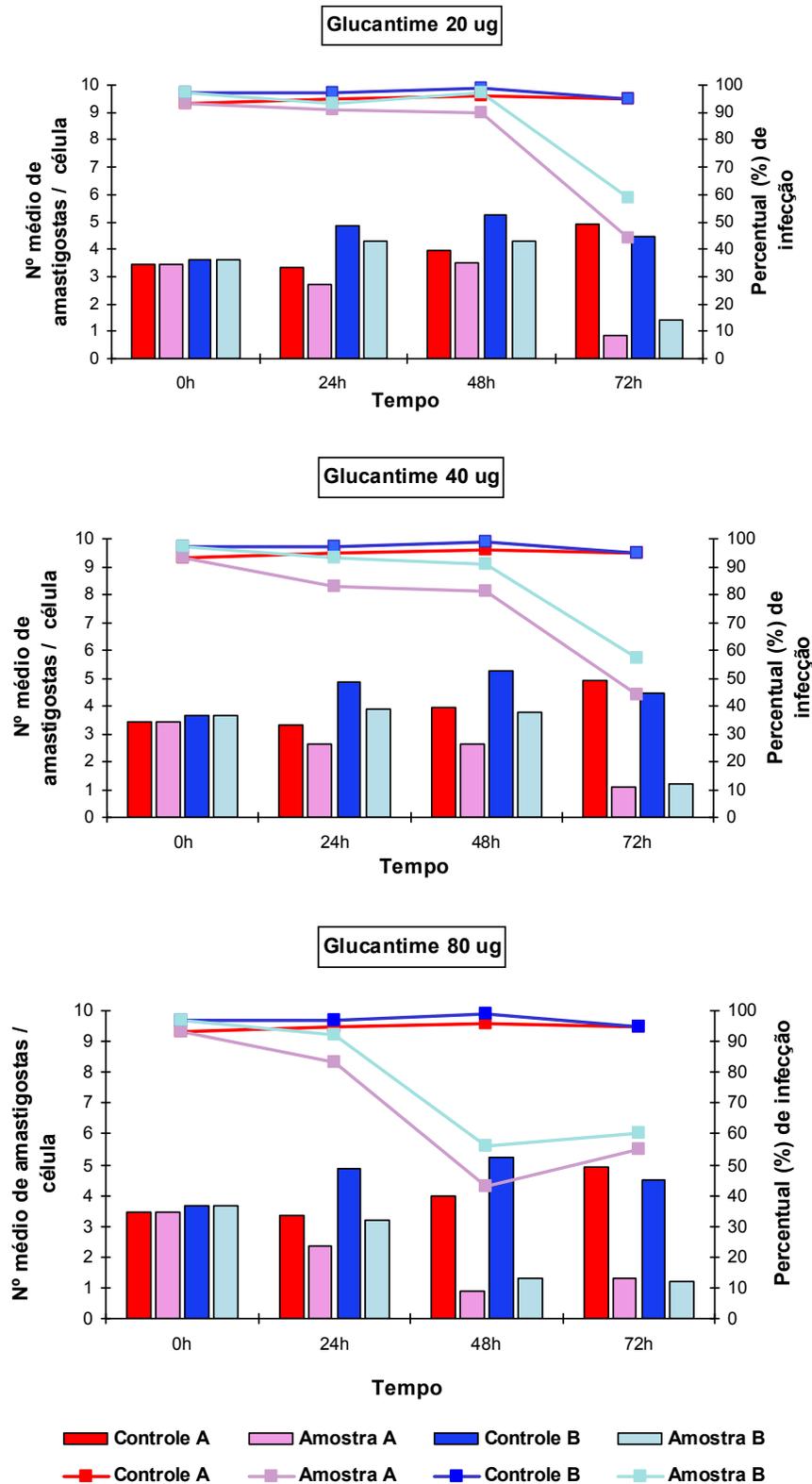


Figura 16: Percentual de células infectadas (linhas) e número médio de amastigotas intracelulares (colunas) das amostras A e B do paciente nº 5 e seus respectivos controles, quando expostos às concentrações de 20µg, 40µg e 80µg de antimoniato de meglumina.

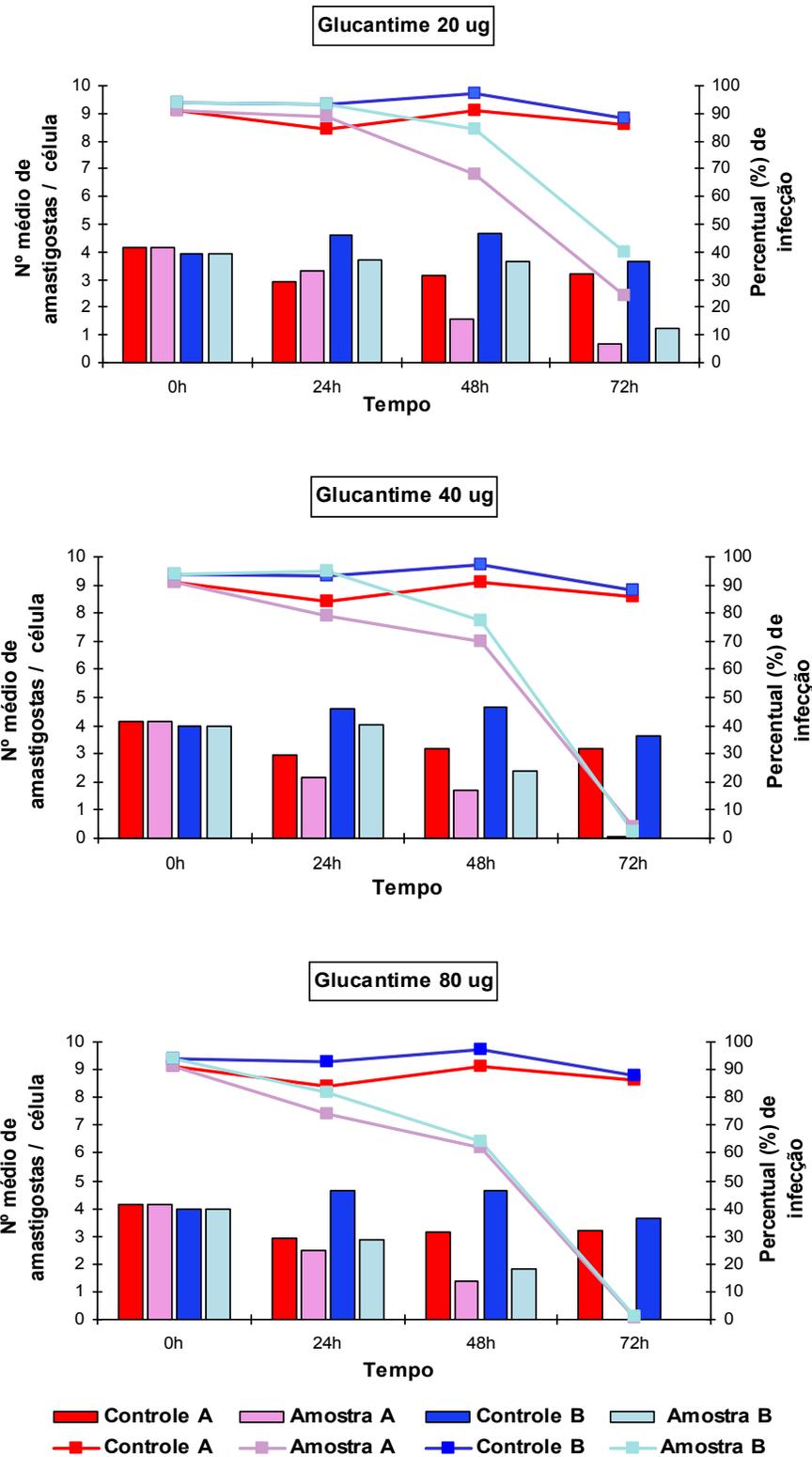


Figura 17: Percentual de células infectadas (linhas) e número médio de amastigotas intracelulares (colunas) das amostras A e B do paciente nº 6 e seus respectivos controles, quando expostos às concentrações de 20µg, 40µg e 80µg de antimoniato de meglumina.

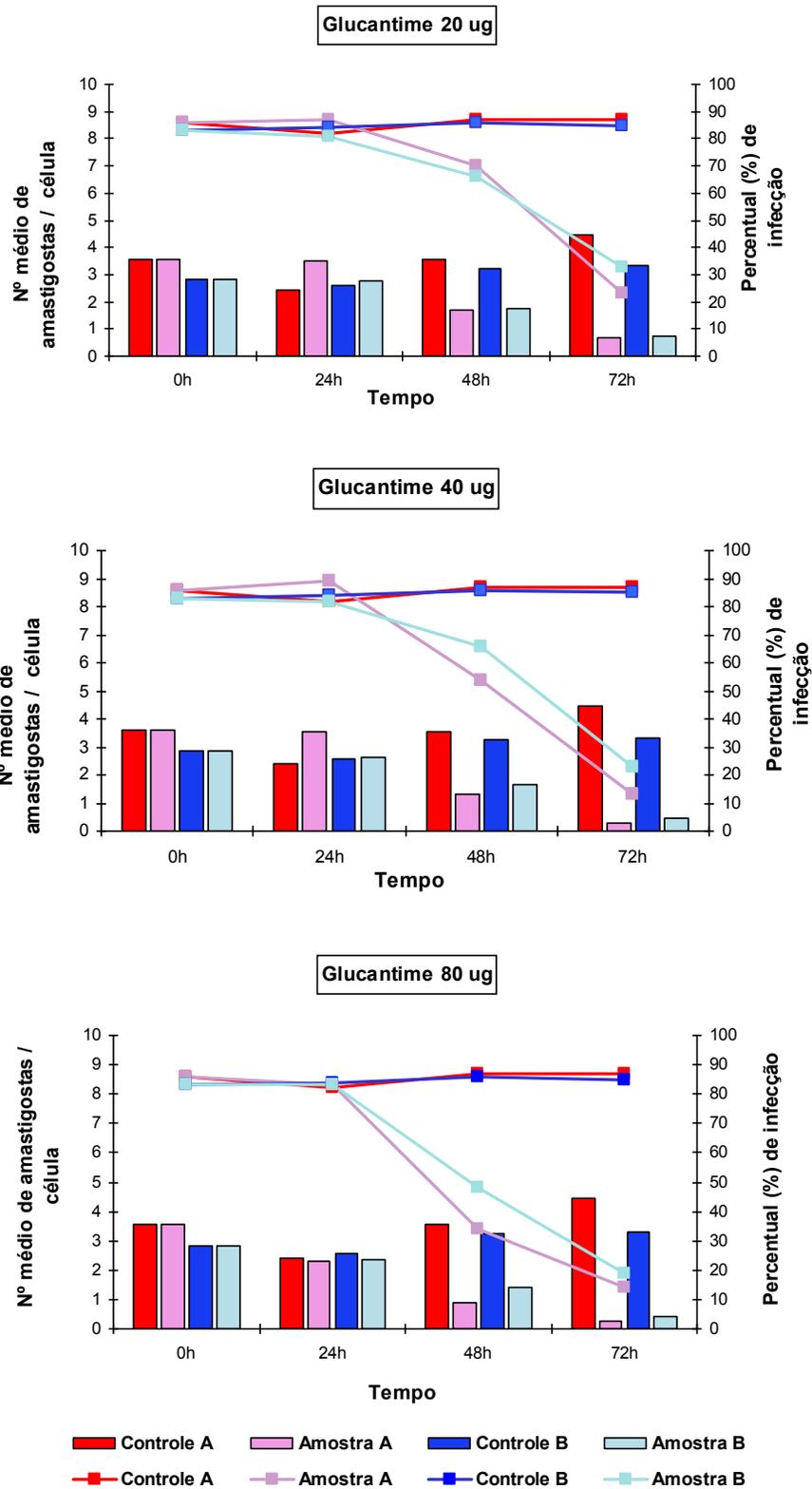


Figura 18: Percentual de células infectadas (linhas) e número médio de amastigotas intracelulares (colunas) das amostras A e B do paciente nº 7 e seus respectivos controles, quando expostos às concentrações de 20µg, 40µg e 80µg de antimoniato de meglumina.

- **Avaliação do Índice de Infecção e da DL₅₀**

No ponto de 72 horas da cinética de infecção com formas amastigotas, todas as concentrações de antimoniato de meglumina (20, 40 e 80 µg/mL) produziram uma redução drástica do percentual de células infectadas e do nº médio de amastigotas intracelulares para a maioria das amostras estudadas (observe os gráficos mostrados nas figuras 12 a 18). Por essa razão, consideramos o ponto de 48 horas para o cálculo do índice de infecção e da DL₅₀.

Os valores da DL₅₀ variaram de 11,7 a 44,3 µg/Sb^v/mL para as amostras **A** e de 13,7 a 52,7 µg/Sb^v/mL para as amostras **B**. Analisando as proporções entre **A** e **B**, observamos que os valores da DL₅₀ das amostras **B** foram superiores a **A**, em cinco dos sete pacientes avaliados. No paciente 4, a DL₅₀ da amostra **B** foi 8% superior a da amostra **A**. Nos pacientes 2, 3 e 5 ocorreu um aumento de 17 a 20% na DL₅₀ das amostras **B** em relação a **A**. Já para o paciente 6 este aumento foi de 100%. Não houve diferença na DL₅₀ das amostras **A** e **B** dos pacientes 1 e 7.

Os valores da DL₅₀ estão apresentados na tabela 4 e os gráficos da curva dose-resposta das sete amostras pareadas (**A** e **B**) são apresentados na figura 19. A DL₅₀ é indicada através do ponto de interseção da curva (considerando 50% do eixo Y) com o valor, em µg/mL, de antimoniato de meglumina (eixo X).

Tabela 4: Valores de DL₅₀ (µg/mL) para formas amastigotas obtidos no ponto de 48 horas de exposição ao antimoniato de meglumina, para as amostras A e B dos sete pacientes avaliados neste estudo.

| Nº do paciente | DL ₅₀ (µg/mL) | |
|----------------|--------------------------|-----------|
| | Amostra A | Amostra 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 |

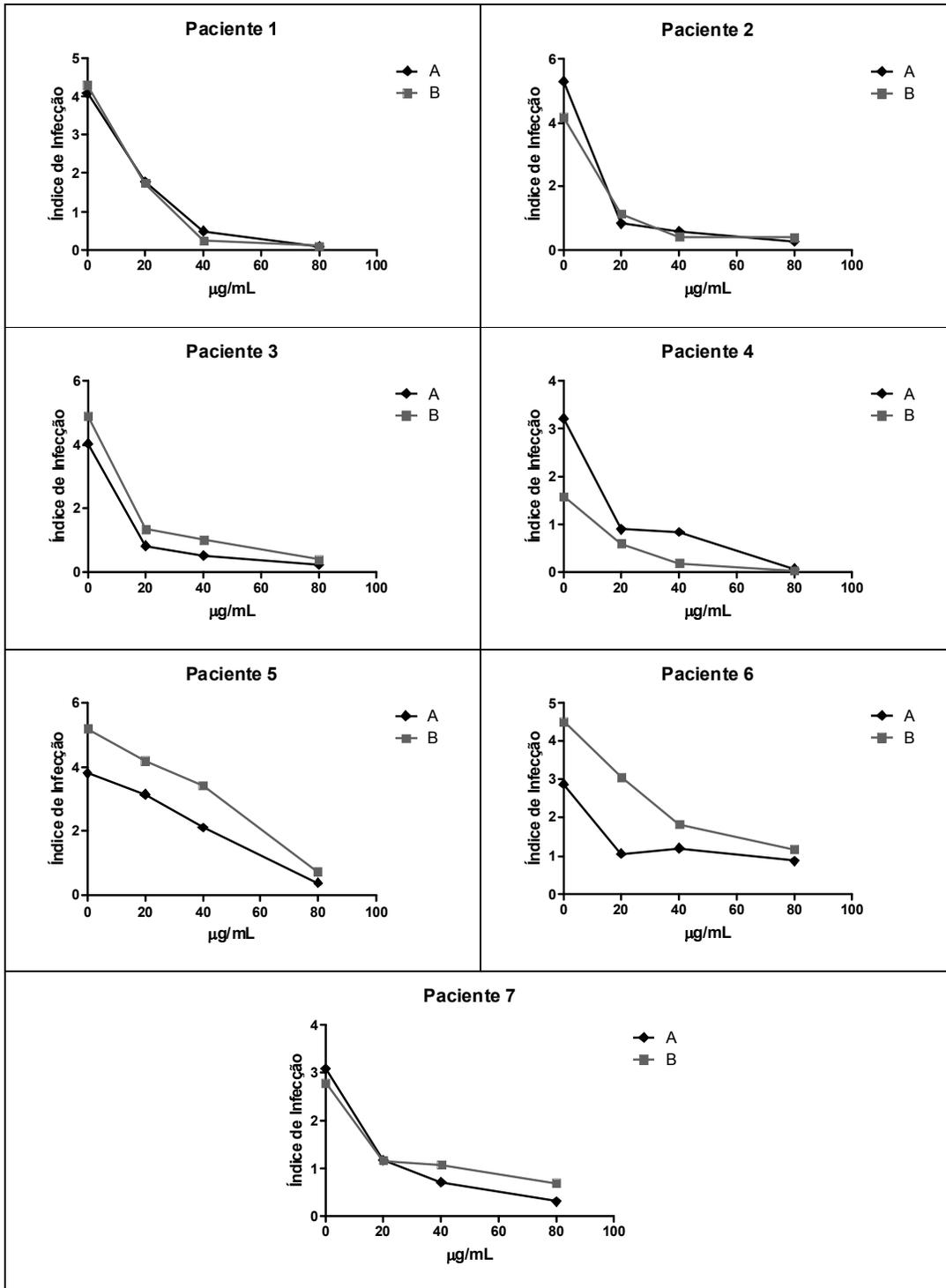


Figura 19: Gráficos das curvas dose-resposta obtidos para cada par de amostras A e B, nos ensaios com formas amastigotas. O índice de infecção considerou o percentual de células infectadas e o número médio de amastigotas intracelulares no ponto de 48 horas.

5. DISCUSSÃO

No Estado do Rio de Janeiro, *L. braziliensis* é a principal espécie envolvida nos casos de LTA. A transmissão ocorre no domicílio e peridomicílio, acometendo homens e mulheres de todas as faixas etárias. A apresentação clínica mais frequente é a úlcera cutânea única (KAWA & SABROZA, 2002; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994). Dos pacientes estudados, todos oriundos do município do Rio de Janeiro, havia homens e mulheres com diferentes idades. A apresentação clínica predominante foi a úlcera cutânea única. Todas as amostras isoladas foram identificadas como *L. braziliensis*.

Poucos são os investimentos na formulação de novos compostos para o tratamento das leishmanioses, permanecendo os antimoniais pentavalentes como medicamentos de primeira escolha para o tratamento de todas as formas clínicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A efetividade dos antimoniais apoia-se em larga experiência clínica. Acredita-se que o risco de reativação e o desenvolvimento de lesões mucosas estejam associados, principalmente, a esquemas terapêuticos incompletos ou administrados de forma inadequada (WEIGLE et al., 1985).

Há vários anos, no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ), utiliza-se com sucesso a dose de 5mg Sb^V/Kg/dia e o tratamento intralesional (OLIVEIRA-NETO et al., 1997b; DE CAMARGO FERREIRA et al., 2010; OLIVEIRA-NETO et al., 1996; OLIVEIRA-NETO et al., 1997a; OLIVEIRA-NETO et al., 1997b; SCHUBACH et al., 2005). Ambos esquemas foram instituídos visando diminuir os efeitos adversos observados quando doses altas são administradas, particularmente, em idosos ou indivíduos com distúrbios cardíacos e/ou renais (SCHUBACH et al., 2005).

Entretanto, os pacientes selecionados para este estudo apresentaram falha ou reativação documentadas por isolamento de *L. braziliensis* antes e após o primeiro tratamento pelo antimoniato de meglumina. Dos sete pacientes incluídos, cinco haviam sido tratados com 5mg/Sb^V/Kg IM e dois por via IL.

Destes, pelos critérios adotados neste estudo, quatro apresentaram falha terapêutica, ou seja, não responderam ao tratamento inicial, diferente dos critérios do MS, que considera falha terapêutica somente após dois esquemas terapêuticos. Nos três casos de reativação, houve cura clínica ao primeiro tratamento, com epitelização completa da lesão, a qual reativou após um período que variou de 13 (2 pacientes) a 27 meses (1 paciente).

A variabilidade na resposta terapêutica pode estar associada a fatores do hospedeiro, ao esquema terapêutico utilizado ou a características intrínsecas dos parasitas envolvidos.

Variáveis como idade, esquema terapêutico, forma clínica, número de lesões, tempo de evolução da doença e presença de co-morbidades podem influenciar a resposta ao tratamento. Embora o grupo estudado tenha sido pequeno, tais variáveis foram muito diversificadas, não sendo possível estabelecer qualquer correlação com a resposta ao tratamento.

O desfecho final desse grupo também variou: um paciente abandonou o tratamento sendo ignorado o desfecho; dois curaram com o mesmo esquema empregado inicialmente; e quatro pacientes curaram com Anfotericina B ministrada após o 2º ou 3º tratamento. A Anfotericina B é indicada nos casos que não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente ou na impossibilidade de seu uso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Outra variável que pode também interferir na apresentação clínica e na resposta ao tratamento é a espécie de parasita envolvido ou o polimorfismo genético de subpopulações. A espécie *L. braziliensis* causa lesões cutâneas e mucosas e é composta por subpopulações com elevada variabilidade genética. No entanto, no estado do Rio de Janeiro, apesar de diferentes padrões clínicos, bem como variadas respostas ao tratamento serem relatados, o perfil genético das subpopulações de *L. braziliensis* é considerado homogêneo (BAPTISTA et al., 2009).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que *L. braziliensis* apresenta maior sensibilidade aos antimoniais quando comparada com outras espécies (AZEREDO-COUTINHO et al., 2007). A taxa de cura em pacientes infectados por *L. braziliensis* também é maior do que em pacientes infectados por *L. mexicana* (NAVIN et al., 1992). Em estudo de meta-análise sobre o tratamento da leishmaniose cutânea em pacientes brasileiros infectados por *L. braziliensis*,

encontrou-se uma taxa de cura em torno de 71,3% (TUON et al., 2008). Em outro estudo, conduzido no Peru, Arevalo et al. (1997) observaram forte associação da espécie de *Leishmania* com a resposta terapêutica. Esses resultados estão de acordo com a resposta favorável aos antimoniais observada no Rio de Janeiro e apontam para a necessidade de identificação da espécie envolvida (SCHUBACH et al., 2005).

O desenvolvimento da resistência parasitária, principalmente aos antimoniais, vem sendo debatido nos últimos anos (OUELLETTE et al., 1998, 2004; SUNDAR et al., 2001; BASSELIN et al., 1997; GUERIN et al. 2002; CROFT et al., 2006). Tal fenômeno poderá causar sério impacto no controle da leishmaniose tegumentar e da leishmaniose visceral, uma vez que o arsenal terapêutico disponível é limitado (SANTOS et al., 2008; MISHRA et al., 2007; BERMAN, 2003). Até o presente, não existe um marcador molecular que possa determinar com segurança a resistência de parasitas do gênero *Leishmania* aos antimoniais (CHAKRAVARTY & SUNDAR, 2010).

Alguns estudos sugerem a possível indução da resistência parasitária relacionada aos esquemas terapêuticos empregados. A exposição descontínua aos antimoniais, em ensaios *in vitro* com formas promastigotas, pode selecionar clones de parasitas resistentes ao fármaco (GROGL et al., 1989). Tais resultados apoiam a hipótese de que as falhas ao tratamento poderiam estar associadas a possível resistência parasitária relacionada aos esquemas terapêuticos empregados. Essa observação foi fortalecida a partir dos relatos de Sundar et al. (1994), na Índia, onde o uso descontrolado dos antimoniais para o tratamento da leishmaniose visceral foi associado aos casos onde houve falha terapêutica (SUNDAR et al., 1994).

Ensaios *in vitro* de sensibilidade de isolados de *Leishmania* aos antimoniais têm sido empregados na tentativa de se estabelecer uma relação entre sensibilidade *in vitro* e resposta terapêutica dos pacientes. Nesse contexto, amostras isoladas de pacientes respondedores e não respondedores aos antimoniais têm sido avaliadas objetivando correlacionar os resultados *in vitro* aos da terapia *in vivo* (AZEREDO-COUTINHO et al., 2007; JACKSON et al., 1990; MOREIRA et al., 1998; RIJAL et al., 2007). Lira et al. (1999) na Índia, demonstraram que amostras de *L. donovani*, isoladas de pacientes não respondedores ao tratamento pelos antimoniais apresentavam valores da DL₅₀

três vezes maiores do que amostras isoladas de pacientes respondedores ao mesmo fármaco (LIRA et al., 1999).

Em outro estudo realizado na Índia, 14 amostras de *L. infantum* pareadas, isoladas antes e depois da terapêutica, de pacientes não respondedores ao antimoniato de meglumina foram avaliados. Treze das 14 amostras testadas mostraram valores da DL₅₀ mais elevados para o isolado obtido após a terapêutica quando comparado com a amostra obtida antes do tratamento (FARAUT-GAMBARELLI et al., 1997).

Em nosso estudo, avaliamos 7 pares de amostras de *L. braziliensis* isolados de pacientes com LC antes do tratamento e após falha terapêutica ou reativação após o tratamento inicial com antimoniato de meglumina. Não foi possível correlacionar os resultados obtidos *in vitro* com a resposta dos pacientes a terapêutica, uma vez que o grupo estudado apresentava diferentes esquemas terapêuticos e respostas variadas ao tratamento.

Para a realização desses estudos, os isolados de *Leishmania* devem ser preservados de modo que os repiques para manutenção não selecionem subpopulações parasitárias, o que poderia interferir nos resultados dos ensaios. O isolamento em cultura, por sua vez, é considerado padrão de referência no diagnóstico das leishmanioses. Entretanto, variações nos resultados podem estar relacionados ao tempo de evolução das lesões, à infraestrutura laboratorial disponível e aos meios de cultura utilizados para o isolamento e cultivo desses parasitas. *Leishmania braziliensis* é considerada a espécie de *Leishmania* com maior dificuldade de crescimento em determinados meios de cultura. Neste estudo, empregamos o meio bifásico NNN + Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) para o isolamento e crescimento das amostras, ambos considerados excelentes.

Sabe-se que o potencial infectivo e a fase de crescimento de amostras de *Leishmania* são características que devem ser estabelecidas quando se propõe avaliar a sensibilidade *in vitro* aos agentes terapêuticos. A expressão de diferentes proteínas de superfície está relacionada a determinadas fases do crescimento. Após inúmeras passagens em cultura, parasitas do gênero *Leishmania* perdem a capacidade infectiva para o hospedeiro vertebrado (BATES, 1993,1995). Para a realização deste estudo, foi necessária a

manutenção da infectividade das amostras e o conhecimento do perfil da curva de crescimento.

Para a manutenção da infectividade, o protocolo do banco de amostras do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (IPEC/Fiocruz) prevê que as amostras isoladas a partir da rotina para o diagnóstico sejam criopreservadas logo após o isolamento. Todas as amostras avaliadas neste estudo foram recuperadas deste banco. Inicialmente, as amostras foram descongeladas, expandidas em meio de cultura e novamente criopreservadas em lotes, para que todos os ensaios empregassem parasitas em uma única fase. Tal procedimento visou diminuir possíveis variações entre os lotes utilizados, já que o crescimento *in vitro* pode selecionar subpopulações.

A curva de crescimento foi realizada para determinar a fase estacionária das amostras, sendo tal fase obtida para todas as amostras (**A** e **B**) entre o 3º e 4º dia do crescimento. Tais resultados estão de acordo com outros estudos (MOREIRA et al., 1998). Os pares de amostras **A** e **B** isoladas de um mesmo paciente apresentaram perfis de crescimento semelhantes. Eventuais diferenças no perfil de crescimento poderiam estar associadas à heterogeneidade dessas amostras e indicar a necessidade de considerações adicionais sobre o parâmetro de crescimento *in vitro* (CALLAHAN et al., 1997). Um fato interessante observado em nosso estudo foi que as amostras **A**, isoladas antes da terapêutica, apresentaram número médio de parasitas maior em todos os pontos da curva, quando comparados com as amostras **B**, isoladas após a terapêutica, exceto para o paciente nº 6. Este fato poderia sugerir que a exposição prévia ao tratamento poderia diminuir a capacidade de multiplicação de formas promastigotas *in vitro*. No entanto, quando observamos a capacidade infectiva para macrófagos murinos não encontramos diferenças entre as amostras **A** e **B**.

Formas promastigotas de *Leishmania* são amplamente utilizadas em ensaios *in vitro* para avaliação de compostos leishmanicidas, principalmente pela facilidade do manuseio. Formas amastigotas necessitam da célula hospedeira ou de determinadas condições para obtenção de amastigotas axênicas (CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998). A limitação da utilização de formas promastigotas nesses ensaios deve-se ao fato desta não ser a forma evolutiva presente no hospedeiro vertebrado. Outro inconveniente é a baixa

sensibilidade dessas formas ao antimoniato de meglumina, necessitando de doses mais elevadas do que as usuais para ensaios com formas amastigotas (AZEREDO-COUTINHO et al., 2007).

Para os experimentos com formas promastigotas, foram necessários alguns testes de padronização relacionados à concentração do antimoniato de meglumina, visto que na literatura os resultados são muito variados. Nos ensaios de padronização, concentrações inferiores a 1mg/mL de antimoniato de meglumina, utilizando uma amostra de *L. braziliensis* isolada de paciente que apresentou boa resposta terapêutica, a DL₅₀ não pode ser determinada, indicando que doses mais elevadas seriam necessárias. Portanto, as concentrações de antimoniato de meglumina utilizadas variaram de 8,1 mg/mL até 3,955 µg/mL.

Verificamos que todas as amostras **B** apresentaram valores da DL₅₀ superiores quando comparadas com as amostras **A**, exceto para o paciente nº 2, tanto em 24 quanto em 48 horas de exposição ao fármaco. Esse resultado sugere que amostras isoladas após a terapêutica possam ser menos sensíveis ao antimoniato de meglumina no modelo com promastigotas. A DL₅₀ variou de 0,37 a 5,86 mg/Sb^v/mL para as amostras **A** e de 0,89 a 7,80 mg/Sb^v/mL para as amostras **B** em 24 horas de exposição ao antimoniato de meglumina. Em 48 horas de exposição, os valores de DL₅₀ obtidos foram de 0,37 a 5,75 mg/Sb^v/mL para as amostras **A** e de 0,7 a 7,68 mg/Sb^v/mL para **B**. Estes resultados estão de acordo com outros estudos com formas promastigotas, cujos valores da DL₅₀ variaram de 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).

Para os ensaios com formas amastigotas utilizamos infecção *in vitro* de macrófagos murinos, expostos às concentrações de 20, 40 e 80µg/mL de antimoniato de meglumina. Foram avaliados dois parâmetros: percentual de células infectadas e número médio de parasitas por célula. Os resultados apresentados pelos controles das amostras **A** e **B** sugerem que a exposição ao tratamento não interferiu na capacidade infectiva para os macrófagos murinos.

As concentrações de antimoniato de meglumina utilizadas neste estudo foram efetivas, quando comparadas com os respectivos controles, principalmente a partir de 24 horas de exposição. Este resultado está de acordo com outros estudos, que demonstraram doses efetivas para a forma

amastigota intracelular entre 19 e 55 $\mu\text{g/mL}$ (AZEREDO-COUTINHO et al., 2007). Adicionalmente, em pacientes sob tratamento com baixa dose de antimoniato de meglumina (5 mg $\text{Sb}^{\text{V}}/\text{Kg}/\text{dia}$), encontrou-se um valor médio de 43,6 $\mu\text{g/mL}$ da concentração plasmática de antimônio, avaliado logo após a administração do fármaco (NEVES et al., 2009). Este dado demonstra que as concentrações de antimoniato de meglumina utilizadas *in vitro* em nosso estudo e que foram efetivas para formas amastigotas, aproximam-se também das concentrações séricas observadas *in vivo*.

Analisando visualmente os gráficos de nº 12 a 18, observamos que as amostras não apresentaram grandes diferenças entre **A** e **B**, por ambos os parâmetros avaliados. Já a partir dos valores da DL_{50} obtidos, constatamos que as amostras **B** apresentaram valores mais elevados que a amostra **A** em 4 pacientes, sendo em um caso (paciente 6), observado aumento de 100%. Esse resultado é interessante, já que esse paciente apresentou cura no retratamento pelo uso de antimoniato de meglumina, demonstrando que talvez o resultado obtido *in vitro* possa não representar resistência ao antimonial pentavalente *in vivo*.

Os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* devem ser considerados com cautela. A suscetibilidade ao fármaco *in vitro*, comparando formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* é muito variável, devido, principalmente às diferenças biológicas entre ambas as formas. Adicionalmente, resultados de sensibilidade obtidos nos ensaios *in vitro* podem também não ser correlacionados com a resposta observada ao tratamento. (GROGL et al., 1992; BERMAN et al., 1980; ROBLEDO et al., 1999). Zauli-Nascimento et al. (2010) não encontraram qualquer correlação entre os resultados de sensibilidade *in vitro* com a resposta clínica dos pacientes.

No presente estudo, as amostras **A** e **B** tanto de formas promastigotas quanto de formas amastigotas foram sensíveis ao antimoniato de meglumina. No entanto, valores da DL_{50} obtidos para formas promastigotas não puderam ser correlacionados aos resultados com formas amastigotas. Estes resultados estão em desacordo com Azeredo-Coutinho et al. (2007), que relataram significativa correlação de sensibilidade ao antimoniato de meglumina entre amostras de formas promastigotas e amastigotas de um mesmo isolado de *L. braziliensis*.

Estudos de sensibilidade *in vitro* com amostras pareadas são raros. Embora o número de amostras avaliadas neste estudo tenha sido pequeno, as informações obtidas devem ser consideradas relevantes.

Outra questão a ser abordada é se baixas doses de antimonial e cursos terapêuticos curtos por via IL estão ou não associados à falha terapêutica e à indução de resistência ao tratamento. Níveis favoráveis de resposta vêm sendo observados em esquemas empregando baixa dose ou via IL (OLIVEIRA-NETO et al., 1997b; DE CAMARGO FERREIRA et al., 2010; OLIVEIRA-NETO et al., 1996; OLIVEIRA-NETO et al., 1997a; OLIVEIRA-NETO et al., 1997b; SCHUBACH et al., 2005). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a dose de 5mg Sb^V/kg/dia IM ou o regime intralesional aparentemente não induziram a seleção de amostras de *L. braziliensis* resistentes *in vitro* em pacientes que apresentaram falha terapêutica *in vivo*. Outros fatores devem ter influenciado a resposta terapêutica observada nesse grupo. O paciente que apresentou um aumento de 100% da DL₅₀ da amostra **B** em relação a amostra **A** nos ensaios com amastigota, foi curado com o próprio antimoniato de meglumina.

De acordo com Zauli-Nascimento et al. (2010), no Brasil não existem evidências de resistência parasitária primária como a relatada em outras áreas endêmicas. No estado do Rio de Janeiro casos de insucesso terapêutico estão sendo monitorados por uma equipe multidisciplinar. Futuras análises, em um número maior de isolados, acrescidos de novos marcadores, poderão contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na falha terapêutica ou reativação de lesões cutâneas na LTA.

6. CONCLUSÕES

- Todas as amostras pareadas (**A** e **B**) apresentaram perfil de crescimento similar, cuja fase estacionária variou entre o 3º e 4º dia;
- Nos ensaios com formas promastigotas, as amostras **B** apresentaram valores de DL₅₀ maiores que as amostras **A**, sugerindo menor sensibilidade das amostras **B** quando avaliadas sob este modelo;
- Nos ensaios com formas amastigotas, as amostras **A** e **B** não apresentaram diferenças expressivas nos valores da DL₅₀, com exceção de um paciente cuja DL₅₀ de **B** foi 100% maior do que em **A**;
- Formas promastigotas e amastigotas (amostras **A** e **B**) foram sensíveis ao antimoníato de meglumina nas concentrações utilizadas no estudo;
- Não foi possível associar os resultados obtidos com as formas promastigotas e amastigotas;
- O uso de dose baixa de antimonial por via IM ou esquema IL aparentemente não induziram a seleção de amostras de *L. braziliensis* resistentes *in vitro* quando as amostras **A** e **B** foram comparadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arevalo J, Ramirez L, Adai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verastegui C, et al. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary Leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2007 Jun 15;195(12):1846-51.

Azeredo-Coutinho RB, Mendonca SC, Callahan H, Portal AC, Max G. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. *J Parasitol*. 2007 Jun;93(3):688-93.

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. *Experimental parasitology*. 2009 Apr;121(4):317-22.

Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 1995 Sep;53(3):256-9.

Barroso-Freitas AP, Passos SR, Mouta-Confort E, Madeira MF, Schubach AO, Santos GP, et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary Leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009 Apr;103(4):383-9.

Basano SA, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Bras Epidemiol*. 2004:328-37.

Basselin M, Lawrence F, Robert-Gero M. Altered transport properties of pentamidine-resistant *Leishmania donovani* and *L. amazonensis* promastigotes. *Parasitology research*. 1997;83(5):413-8.

Bates PA. Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. *Parasitology today* (Personal ed. 1993 Apr;9(4):143-6.

Bates PA. The lipophosphoglycan-associated molecules of *Leishmania*. *Parasitology today* (Personal ed. 1995 Sep;11(9):317-8.

Berman J. Current treatment approaches to Leishmaniasis. *Current opinion in infectious diseases*. 2003 Oct;16(5):397-401.

Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical mechanisms of the antiLeishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1985 Jun;27(6):916-20.

Berman JD, Wyler DJ. An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in Leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1980 Jul;142(1):83-6.

Berman JD. Chemotherapy for Leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Reviews of infectious diseases*. 1988 May-Jun;10(3):560-86.

Berman JD. In vitro susceptibility of antimony-resistant *Leishmania* to alternative drugs. *J Infect Dis*. 1982 Feb;145(2):279.

Bermudez H, Rojas E, Garcia L, Desjeux P, Dujardin JC, Boelaert M, et al. Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary Leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 2006 Oct;100(7):591-600.

Callahan HL, Portal AC, Devereaux R, Grogl M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997 Apr;41(4):818-22.

Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous Leishmaniasis. *Acta Trop*. 1994 Apr;56(4):315-25.

Chakravarty J, Sundar S. Drug resistance in Leishmaniasis. *Journal of global infectious diseases*. 2010 May;2(2):167-76.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in Leishmaniasis. *Clinical microbiology reviews*. 2006 Jan;19(1):111-26.

Cysne-Finkelstein L, Temporal RM, Alves FA, Leon LL. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Experimental parasitology*. 1998 May;89(1):58-62.

Da-Cruz AM, Pirmez C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Coura JR, ed. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2005:697-712.

de Camargo Ferreira EVE, de Oliveira Schubach A, Valete-Rosalino CM, de Souza Coutinho R, Conceicao-Silva F, de Matos Salgueiro M, 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.

Demicheli C, Ochoa R, da Silva JB, Falcao CA, Rossi-Bergmann B, de Melo AL, et al. Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of Leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2004 Jan;48(1):100-3.

Fagundes A, Schubach A, de Paula CC, Bogio A, Antonio Lde F, Schiavoni PB, et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary Leishmaniasis in a referral centre. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010 Feb;105(1):109-12.

Faraut-Gambarelli F, Piarroux R, Deniau M, Giusiano B, Marty P, Michel G, et al. In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral Leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1997 Apr;41(4):827-30.

Frezard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2009;14(7):2317-36.

Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Research in microbiology.* 2004 May;155(4):224-30.

Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. *Expert review of anti-infective therapy.* 2010 Apr;8(4):419-33.

Grimaldi G, Jr., Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical microbiology reviews.* 1993 Jul;6(3):230-50.

Grogl M, Oduola AM, Cordero LD, Kyle DE. *Leishmania* spp.: development of pentostam-resistant clones in vitro by discontinuous drug exposure. *Experimental parasitology.* 1989 Jul;69(1):78-90.

Grogl M, Thomason TN, Franke ED. Drug resistance in Leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1992 Jul;47(1):117-26.

Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral Leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet infectious diseases.* 2002 Aug;2(8):494-501.

Gustavo Romero, Marcia Sousa, Armando Schubach, Elza Noronha, Márcia Hueb, Marise Mattos. Simpósio - Critérios para a avaliação da eficácia terapêutica na leishmaniose cutânea. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 38 (Supl IV). 2005:38-42.

Jackson JE, Tally JD, Ellis WY, Mebrahtu YB, Lawyer PG, Were JB, et al. Quantitative in vitro drug potency and drug susceptibility evaluation of *Leishmania* spp. from patients unresponsive to pentavalent antimony therapy. Am J Trop Med Hyg. 1990 Nov;43(5):464-80.

Jones TC, Johnson WD, Jr., Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, et al. Epidemiology of American cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. J Infect Dis. 1987 Jul;156(1):73-83.

Kawa H, Sabroza PC. [Spatial distribution of tegumentary Leishmaniasis in the city of Rio de Janeiro]. Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica. 2002 May-Jun;18(3):853-65.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, eds. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press 1987:1-120.

Linares GE, Ravaschino EL, Rodriguez JB. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. Current medicinal chemistry. 2006;13(3):335-60.

Lira R, Sundar S, Makharia A, Kenney R, Gam A, Saraiva E, et al. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. J Infect Dis. 1999 Aug;180(2):564-7.

Machado GM, Leon LL, De Castro SL. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Feb;102(1):73-7.

Marsden PD, Sampaio RN, Carvalho EM, Veiga JP, Costa JL, Llanos-Cuentas EA. High continuous antimony therapy in two patients with unresponsive mucosal Leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1985 Jul;34(4):710-3.

Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral Leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica. 1994;10 Suppl 2:359-75.

Ministério da Saúde M, Secretaria de Vigilância em Saúde S. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial. Brasília: Editora do Ministério da Saúde 2006.

Ministério da Saúde M, Secretaria de Vigilância em Saúde S. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª edição ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde 2009.

Ministério da Saúde M, Secretaria de Vigilância em Saúde S. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª edição atualizada ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde 2010.

Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of Leishmaniasis: past, present and future. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(10):1153-69.

Moreira ES, Anacleto C, Petrillo-Peixoto ML. Effect of glucantime on field and patient isolates of New World Leishmania: use of growth parameters of promastigotes to assess antimony susceptibility. *Parasitology research*. 1998 Sep;84(9):720-6.

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 Mar;165(3):528-34.

Neves DB, Caldas ED, Sampaio RN. Antimony in plasma and skin of patients with cutaneous leishmaniasis--relationship with side effects after treatment with meglumine antimoniate. *Trop Med Int Health*. 2009 Dec;14(12):1515-22.

Nussbaum K, Honek J, Cadmus CM, Efferth T. Trypanosomatid parasites causing neglected diseases. *Current medicinal chemistry*. 2010;17(15):1594-617.

Oliveira Neto MP, Schubach A, Araujo ML, Pirmez C. High and low doses of antimony (Sbv) in American cutaneous Leishmaniasis. A five years follow-up study of 15 patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996 Mar-Apr;91(2):207-9.

Oliveira-Neto MP, Mattos M, Souza CS, Fernandes O, Pirmez C. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous Leishmaniasis. *Int J Dermatol*. 1998 Nov;37(11):846-9.

Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-Cruz AM, Fernandes O, Moreira J, et al. American tegumentary Leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermatol*. 2000 Jul;39(7):506-14.

Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC, Pirmez C. Treatment of American cutaneous Leishmaniasis: a comparison between low dosage (5 mg/kg/day) and high dosage (20 mg/kg/day) antimony regimens. *Pathologie-biologie*. 1997a Jun;45(6):496-9.

Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC, Pirmez C. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous Leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg*. 1997b Dec;57(6):651-5.

Oliveira-Neto MP. Leishmaniose tegumentar no estado do Rio de Janeiro. Estudo de 648 casos observados no Hospital Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz. [Tese de Doutorado]: Instituto Oswaldo Cruz; 1998.

Ouellette M, Drummel-Smith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat*. 2004 Aug-Oct;7(4-5):257-66.

Ouellette M, Legare D, Haimeur A, Grondin K, Roy G, Brochu C, et al. ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. *Drug Resist Updat*. 1998 Mar;1(1):43-8.

Ouellette M, Papadopoulou B. Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasitology today (Personal ed)*. 1993 May;9(5):150-3.

Palacios R, Osorio LE, Grajalew LF, Ochoa MT. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania Viannia* species. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Mar-Apr;64(3-4):187-93.

Rijal S, Yardley V, Chappuis F, Decuypere 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 and infection / Institut Pasteur*. 2007 Apr;9(4):529-35.

Roberts WL, Berman JD, Rainey PM. In vitro antiLeishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995 Jun;39(6):1234-9.

Robledo SM, Valencia AZ, Saravia NG. Sensitivity to Glucantime of *Leishmania Viannia* isolated from patients prior to treatment. *J Parasitol*. 1999 Apr;85(2):360-6.

Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science (New York, NY)*. 1984 Mar 30;223(4643):1417-9.

Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, et al. Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. *Parasitology research*. 2008 Jun;103(1):1-10.

Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraive W, Pirmez C, Grimaldi G, Jr., et al. Detection of Leishmania DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis*. 1998b Sep;178(3):911-4.

Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira AL, 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*. 1998a Jun;58(6):824-7.

Schubach AO, 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 May-Jun;38(3):213-7.

Sundar S, Thakur BB, Tandon AK, Agrawal NR, Mishra CP, Mahapatra TM, et al. Clinicoepidemiological study of drug resistance in Indian kala-azar. *BMJ (Clinical research ed)*. 1994 Jan 29;308(6924):307.

Sundar S. Drug resistance in Indian visceral Leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 2001 Nov;6(11):849-54.

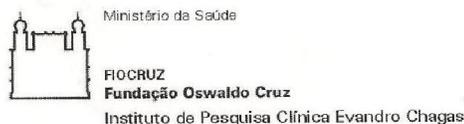
Tuon FF, Amato VS, Graf ME, Siqueira AM, Nicodemo AC, Amato Neto V. Treatment of New World cutaneous Leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis. *Int J Dermatol*. 2008 Feb;47(2):109-24.

Weigle KA, Valderrama L, Santrich C, Saravia NG. Recurrences of tegumentary Leishmaniasis. *Lancet*. 1985 Sep 7;2(8454):557-8.

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 Jan;15(1):68-76.

ANEXOS

Anexo A – Aprovação no CEP



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 052/2010

Protocolo 0050.0.009.000-10

1. Identificação:

Título do Projeto: “*Leishmania (Viannia) braziliensis*: avaliação da sensibilidade ao antimonial pentavalente *in vitro* com amostras isoladas de pacientes que apresentaram falha terapêutica”.

Pesquisadora Responsável: Maria de Fátima Madeira.

Mestranda: Luciana de Freitas Campos Miranda.

Instituição Responsável: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ.

Data de Apresentação ao CEP: 30/09/2010.

2. Sumário:

Visa a avaliar a sensibilidade *in vitro* ao antimonial pentavalente de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* obtidas de pacientes com LTA, antes e após o tratamento. Tem como objetivos específicos: a) Estabelecer a curva de crescimento, de formas promastigotas, dos pares de amostras selecionadas para o estudo; b) Avaliar a sensibilidade de formas promastigotas a diferentes concentrações do antimonial pentavalente, estabelecendo a DL₅₀ para os isolados obtidos antes e após a terapêutica; c) Avaliar a sensibilidade, de formas amastigotas em cultura de macrófagos murinos, a diferentes concentrações do antimonial pentavalente, estabelecendo a DL₅₀ para os isolados obtidos antes e após a terapêutica; d) Correlacionar a sensibilidade ao antimonial pentavalente obtida *in vitro*, considerando a amostra isolada antes e após a terapêutica em ambas as formas evolutivas do parasita; e) Correlacionar os resultados obtidos *in vitro* com a resposta clínica dos pacientes aos esquemas terapêuticos. Todas as amostras selecionadas para o estudo estão sendo isoladas de pacientes atendidos no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (VigiLeish) do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fiocruz os quais apresentaram falha terapêutica ou recidiva ao tratamento pelo antimonial pentavalente. Este subprojeto constitui um desdobramento do projeto “Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em Leishmanioses – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-Fiocruz”, aprovado pelo CEP/IPEC em 04/11/02 (protocolo 0016.0.009.000-02), sob responsabilidade de Armando de Oliveira Schubach. A obtenção dos camundongos utilizados no estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética Animal (CEUA-Fiocruz nº P0020-00) do projeto intitulado “Estudos *in vivo* e *in vitro* com amostras de Leishmanias”.

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

"*Leishmania (Viannia) braziliensis*: avaliação da sensibilidade ao antimonial pentavalente *in vitro*, com amostras isoladas de pacientes que apresentaram falha terapêutica"

Projeto com delineamento adequado. Em substituição ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi apresentado um Termo de Compromisso em relação à confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto. Os recursos para a realização do projeto serão obtidos do PA do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses e do CNPq pelo projeto "Ensaio clínico fase III para Leishmaniose Tegumentar Americana. Equivalência entre o esquema padrão e alternativos com antimoniato de meglumina".

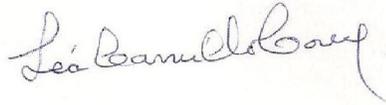
4. Diligências:

Não houve.

5. Parecer: APROVADO.

Data da Reunião: 25 de outubro de 2010.

Assinatura do Coordenador:



Dr.^a Léa Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC / FIOCRUZ