

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

JAMYRA IGLESIAS CATALDO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA ESPÉCIE DE *Leishmania* E DA
COEINFEÇÃO POR PARASITOS INTESTINAIS NO CURSO
CLÍNICO E RESPOSTA TERAPÊUTICA DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA EM PACIENTES TRATADOS COM 5
mg Sb^V/Kg/dia DE ANTIMONIATO DE MEGLUMINA**

Rio de Janeiro

2016

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA ESPÉCIE DE *Leishmania* E DA
COEINFECÇÃO POR PARASITOS INTESTINAIS NO CURSO
CLÍNICO E RESPOSTA TERAPÊUTICA DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA EM PACIENTES TRATADOS COM 5
mg Sb^V/Kg/dia DE ANTIMONIATO DE MEGLUMINA**

JAMYRA IGLESIAS CATALDO

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

Orientadores: Prof. Dra. Maria de Fátima Madeira e Prof. Dra. Fátima Conceição-Silva

Rio de Janeiro

2016

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

C357 Cataldo, Jamyra Iglesias

Avaliação da influência da espécie de *Leishmania* e da coinfeção por parasitos intestinais no curso clínico e resposta terapêutica da leishmaniose tegumentar americana em pacientes tratados com 5 mg Sb^v/Kg/dia de antimoniato de meglumina / Jamyra Iglesias Cataldo. – Rio de Janeiro, 2016.

xii, 76 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2016.

Bibliografia: f. 60-73

1. *Leishmania braziliensis*. 2. Variabilidade genética. 3. Helmintos. 4. Coinfeção. 5. Antimonial pentavalente. 6. Esquemas terapêuticos. I. Título.

CDD 616.9364

JAMYRA IGLESIAS CATALDO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA ESPÉCIE DE *Leishmania* E DA
COEINFEÇÃO POR PARASITOS INTESTINAIS NO CURSO
CLÍNICO E RESPOSTA TERAPÊUTICA DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA EM PACIENTES TRATADOS COM 5
mg Sb^V/Kg/dia DE ANTIMONIATO DE MEGLUMINA**

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

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

Prof. Dr^a. Fátima Conceição-Silva

BANCA EXAMINADORA

Dr. Mauro Célio de Almeida Marzochi (Presidente) INI/Fiocruz

Dr. Armando de Oliveira Schubach (Componente) INI/Fiocruz

Dra. Maria Inês Fernandes Pimentel (Componente) INI/Fiocruz

Dra. Juliana Helena da Silva Barros (Componente) IOC/Fiocruz

Dra. Aline Fagundes da Silva (Componente) INI/Fiocruz

Dra. Eliame Mouta-Confort (Suplente) INI/Fiocruz

“A gente pode morar numa casa mais ou menos, numa rua mais ou menos, numa cidade mais ou menos, e até ter um governo mais ou menos. Pode até dormir numa cama mais ou menos, ter um transporte mais ou menos. O que não pode de jeito nenhum é: ter um amor mais ou menos, namorar mais ou menos, ter fé mais ou menos, beijar mais ou menos. Se não a gente corre o risco de ser uma pessoa, mais ou menos.”

“Às vezes eu fico triste, mas graças a Deus, não sou um espírito triste. A alegria passa por cima de qualquer situação e o bom humor nos ensina a não dar aos acontecimentos infelizes maior importância que eles tenham.”

“Só o riso, o amor e o prazer merecem revanche. O resto, é mais que perda de tempo, é perda de vida.”

Chico Xavier

v

Dedico esta tese

Aos meus pais, Silvia Valeria e Orlando, que desejando para mim o que não tiveram para si, tanto me estimularam e auxiliaram em minha jornada pessoal e profissional.

À minha filha, Sarah, que hoje é minha maior motivação para seguir adiante e alcançar novos objetivos, buscando auxiliar na formação de seu caráter e proporcionar um futuro melhor.

AGRADECIMENTOS

Ser grato é reconhecer no outro o valor que ele tem para nós, ser grato é ter espiritualidade, é saber que dependemos uns dos outros para crescermos. Sendo assim, muitas pessoas têm a minha eterna gratidão.

Primeiramente agradeço a Deus pelas oportunidades e pessoas colocadas em meu caminho, pela força, fé e persistência que tem me dado para conseguir prosseguir em minha jornada.

Ao meu marido, Renato, pelo companheirismo, paciência, compreensão e incentivo durante todos esses anos.

À minha orientadora, Dr^a Maria de Fátima Madeira, que me acolheu muito antes do doutorado, sempre me auxiliando, mostrando-se antes de qualquer coisa uma amiga.

À minha co-orientadora Dr^aFátima Conceição-Silva, auxiliando sempre com seus conhecimentos, idéias e sugestões.

À amiga que o doutorado trouxe, Tatiana Fonseca, por me auxiliar nas técnicas moleculares no laboratório, pelo companheirismo e por tornar os meus dias mais leves.

À Fiocruz, em especial ao Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, por me conceder a oportunidade de estar em um centro de referência há 10 anos, desde a iniciação científica, colaborando em minha formação. Além da concessão da bolsa de estudos.

E a todos que de alguma forma me incentivaram, seja com um gesto, sorriso ou palavras.

CATALDO, JI. **Avaliação da influência da espécie de *Leishmania* e da coinfeção por parasitos intestinais no curso clínico e resposta terapêutica da leishmaniose tegumentar americana em pacientes tratados com 5mg Sb^V/Kg/dia de antimonialto de meglumina.** Rio de Janeiro, 2016. 76 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é um agravo que apresenta ampla complexidade em diferentes aspectos, fato que pode ser resultante da interação entre a resposta imunológica do paciente, das características genéticas das espécies envolvidas na infecção, aspectos epidemiológicos da área endêmica e possíveis coinfeções. No estado do Rio de Janeiro a LTA é causada predominantemente por *L. braziliensis*, com quadros clínicos variados e boa resposta terapêutica ao antimonialto de meglumina, entretanto, o mesmo cenário não é observado em outras regiões do Brasil, onde circulam outras espécies de *Leishmania*. Além disso, pouco se sabe sobre a influência das coinfeções por parasitos intestinais no perfil clínico e resposta terapêutica na LTA. Com base nisto, objetivamos verificar a influência da espécie de *Leishmania* e a ocorrência de coinfeções por parasitos intestinais no curso clínico e terapêutico da LTA. A população do estudo foi constituída por 217 pacientes, provenientes de várias regiões do Brasil, tratados com baixa dose (5mg/Kg/dia) de Sb^V(antimonial pentavalente). Para caracterização das espécies de *Leishmania* foi utilizada a técnica de eletroforese de isoenzimas e os parasitos intestinais foram diagnosticados através das técnicas de Kato-Katz, sedimentação e Baermann-Moraes. Os resultados foram reunidos em dois artigos científicos. No artigo 1, comparamos o desfecho clínico de pacientes com LTA oriundos do estado do Rio de Janeiro (RJ) com pacientes infectados em outros estados (OE). Considerando a utilização de 5mg Sb^V/Kg/dia por 30 dias, cura foi observada em 72% (n=78) dos 108 pacientes estudados, dos quais 59% (n=64) estavam infectados por *L. braziliensis*. Considerando todos os pacientes que necessitaram de cursos adicionais com a mesma dose, 88,9% dos pacientes curaram com 5mg Sb^V/Kg/dia. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos RJ e OE (p=0,254). Uma maior variabilidade genética de *L. braziliensis* foi encontrada em isolados de OE quando comparados aos do RJ. Dados clínicos ou demográficos não foram associados à falha terapêutica. No artigo 2, 109 pacientes foram estudados, comparando casos de LTA coinfectados e não coinfectados por parasitos intestinais. Nos pacientes coinfectados por helmintos, foi observada uma frequência maior de lesões mucosas e má resposta terapêutica (falha e recidiva) quando comparados aos casos com exame parasitológico de fezes negativo e os que tiveram infecções por protozoários. Dentro do grupo de helmintos, os nematódeos, em especial *Ascaris lumbricoides*, tiveram associação com o desenvolvimento da forma mucosa da LTA. Além disso, no grupo de pacientes coinfectados com helmintos, o tempo de cura das lesões foi maior em relação aos não parasitados. Como conclusão geral do nosso estudo, pacientes com LTA causada por *L. braziliensis* de OE responderam de forma satisfatória ao tratamento com Sb^V em baixa dose, quando comparados aos casos oriundos do RJ. Mesmo que preliminar, esse dado sugere que o esquema de baixa dose de Sb^V, utilizado há vários anos no RJ, possa ser estendido para outras regiões do Brasil. Já com relação ao parasitismo intestinal, concluímos que a infecção por helmintos exerce uma influência deletéria no curso clínico e terapêutico na LTA, devendo ser um aspecto a ser considerado durante o manejo do paciente.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*, Variabilidade genética, Helmintos, Coinfeção, Antimonial pentavalente, Esquemas terapêuticos

CATALDO JI. Evaluation of the influence of species of *Leishmania* and co-infection by intestinal parasites in the clinical course and response to therapy of american tegumentary leishmaniasis in patients treated with 5mg Sb^V/kg/day of meglumine antimoniate. Rio de Janeiro, 2016. 76 p. Thesis [PhD Thesis in Clinical Research in Infectious Diseases] – National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas, Oswaldo Cruz Foundation.

ABSTRACT

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is a disease that is highly complex in different aspects, which may be the result of interaction between the immune response of the patient, the genetic characteristics of the species involved in the infection, epidemiological aspects of the endemic area and possible co-infections. In the state of Rio de Janeiro ATL is caused mainly by *L. braziliensis*, with varying clinical pictures and good therapeutic response. However the same scenario is not observed in other regions of Brazil, where other *Leishmania* species also cause the disease. Furthermore, little is known about the influence of co-infections by intestinal parasites in the clinical profile and therapeutic response in ATL. Based on this, we aimed to verify the influence of *Leishmania* species and of the occurrence of coinfection by intestinal parasites in clinical and therapeutic course of ATL. The study population consisted of 217 patients, from various regions of Brazil, treated with low dose (5mg/Kg/day) of Sb^V (pentavalent antimony). For characterization of the *Leishmania* species we used isoenzyme electrophoresis and intestinal parasites were diagnosed through the techniques of Kato-Katz, sedimentation and Baermann-Moraes. The results were gathered in two papers. Article 1, we compared the clinical outcome of patients with ATL acquired in state of Rio de Janeiro (RJ) with infected patients from other states (OS). Considering de the use of 5mg Sb^V/Kg/day during 30 days, cure was observed in 72% (n=78) of 108 patients, from which 59% (n=64) were infected by *L. braziliensis*. Considering the patients who needed additional courses of the same dosis, 88.9% of patients were cured with 5mg Sb^V/kg/day. There was no statistically significant difference between RJ and OS (p=0.254). A greater genetic variability was found in *L. braziliensis* OS isolates when compared to those from RJ. Clinical and demographic data were not associated with treatment failure. Article 2, 109 patients were studied, comparing cases of ATL coinfecting and not coinfecting with intestinal parasites. In patients co-infected with helminths, a higher frequency of mucosal lesions and poor therapeutic response (failure and relapse) was observed when they were compared to cases with negative parasitological feces examination and those who had protozoal infections. Within the helminth group, nematodes, particularly *Ascaris lumbricoides*, were associated with the development of mucosal form of ATL. In addition, in the group of patients coinfecting with helminths, the lesion healing time was higher when compared thenon parasitized. As a general conclusion of our study, patients with ATL caused by *L. braziliensis* from OS responded satisfactorily to treatment with low dose Sb^V, when compared to cases infected in RJ. Although preliminary, this finding suggests that the low-dose regimen of Sb^V used for several years in Rio de Janeiro, can be extended to patients who acquired ATL in other regions of Brazil. In relation to intestinal parasitism, we concluded that helminth infection exerts a deleterious influence on clinical and therapeutic course in ATL and should be an aspect to be considered in the management of patients.

Keywords: *Leishmania braziliensis*, Genetic variability, Helminths, Coinfection, Pentavalent antimony, Treatment regimens

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AM** – Antimoniato de Meglumina
- AQP1** – Aquaporin 1
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- EV** – Endovenosa
- HE** – Hematoxilina-Eosina
- HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana
- HSP70** – Heat Shock Protein 70
- IC50** – Concentração de Inibição Média
- IDRM** – Intradermorreação de Montenegro
- IFN- γ** - Interferon gama
- IL** – Intralesional (esquema terapêutico por via intralesional)
- IL-4**–Interleucina 4
- IL-10** – Interleucina 10
- IM** – Intramuscular
- INI** – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
- L. amazonensis* – *Leishmania amazonensis*
- LaPClinVigiLeish**–Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses
- L. braziliensis* – *Leishmania braziliensis*
- LC** – Leishmaniose cutânea
- LCD** – Leishmaniose cutânea difusa
- L. guyanensis* – *Leishmania guyanensis*
- LM** – Leishmaniose Mucosa
- L. peruviana* – *Leishmania peruviana*
- LTA** – Leishmaniose Tegumentar Americana
- LV** – Leishmaniose Visceral
- MRPA** -Multidrug Resistance associated Protein A
- MS** – Ministério da Saúde
- NNN** - Meio Novy, McNeal e Nicole
- OMS** – Organização Mundial de Saúde

OE– Outros Estados

PCR – Polymerase Chain Reactin (Reação em Cadeia da Polimerase)

RJ – Rio de Janeiro

Sb^V– Antimônio Pentavalente

sp– abreviatura científica para espécie

Th1 – Células T auxiliaadoras (helper) tipo 1

Th2 – Células T auxiliaadoras (helper) tipo 2

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TRYR - Trypanothione reductase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leishmaniose tegumentar americana	1
1.2. Tratamento da LTA.....	7
1.3. Falha terapêutica na LTA.....	10
2. JUSTIFICATIVA.....	16
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo Geral.....	18
3.2. Objetivos Específicos.....	18
4. RESULTADOS.....	19
4.1. Artigo 1:.....	20
Leishmaniose tegumentar americana causada por <i>Leishmania braziliensis</i> de diferentes regiões brasileiras respondem ao tratamento com 5mg Sb ^v /kg/dia de antimoniato de meglumina.....	21
4.2. Artigo 2:.....	433
Intestinal helminth coinfection is associated with mucosal lesions and poor response to therapy in American tegumentary leishmaniasis.....	44
5. DISCUSSÃO.....	52
6. CONCLUSÕES.....	59
7. REFERÊNCIAS	60
ANEXO.....	74
Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.....	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose tegumentar americana

As leishmanioses constituem um grupo de doenças zoonóticas causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania*. São parasitos heteroxênicos que se apresentam sob duas formas principais no seu ciclo evolutivo: promastigotas, flagelados presentes no trato digestivo dos insetos vetores (flebotomíneos), e amastigotas, formas arredondadas, com flagelo rudimentar não exteriorizado, presentes nos vertebrados, em células fagocitárias, como o macrófago (Alexander et al., 1975; Chang et al., 1976; Hommel, 1978; Brewster e Barker, 2002). São doenças mundialmente distribuídas, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS-WHO) como doenças extremamente negligenciadas, pois prevalecem em condições de pobreza e representam uma limitação ao desenvolvimento dos países (WHO, 2010).

Na infecção humana, a apresentação clínica pode variar de formas tegumentares (cutânea localizada, cutâneo-mucosa, cutâneo-difusa e mucosa) a formas viscerais (leishmaniose visceral - LV), dependendo da espécie da *Leishmania* envolvida e também do tipo de resposta imune apresentada pelo hospedeiro. Nas Américas, as diferentes apresentações clínicas das formas tegumentares são genericamente denominadas de Leishmaniose tegumentar americana (LTA), para distingui-las das formas dermatópicas encontradas no Velho Mundo (Bailey et al., 2007).

De acordo com a última atualização do Ministério da Saúde brasileiro (MS), os casos de LTA, considerando o período de 1990 a 2014, estão concentrados na Região Norte e Nordeste. Em 2014, o número de casos registrados foi: 10.387 na região Norte, 4.969 na região Nordeste, 3.038 na região Centro-Oeste, 1.460 na região Sudeste e 373 na região Sul. Os estados com maior número de casos em cada região, de acordo com o site do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), foram Pará e Amazonas (Região

Norte); Bahia e Maranhão (Região Nordeste); Mato-Grosso e Goiás (Região Centro-Oeste); Minas Gerais e São Paulo (Região Sudeste) e Paraná e Santa Catarina (Região Sul) (SINAN, 2014). Entretanto, apesar desses números expressivos e de ser encontrada em praticamente todos os estados brasileiros, nos últimos anos tem havido uma tendência à queda do número de casos notificados da LTA em todo o Brasil (SINAN, 2014; Bedoya-Pacheco et al., 2011).

A LTA possui espectro clínico amplo, capaz de produzir desde lesões cutâneas, que se curam facilmente, até lesões em mucosas, que podem causar deformidades e afetar psicologicamente, socialmente e economicamente o indivíduo. No Brasil, a doença humana é causada por pelo menos sete diferentes espécies de *Leishmania* dermatrópicas, o que certamente contribui para diversidade de padrões clínicos e epidemiológicos nas diferentes regiões brasileiras (Brasil, 2013). Devido a essa complexidade, a classificação clínica da LTA pode ser dividida em dois grupos: leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM) (Marzochi e Marzochi, 1994).

De uma forma geral, independentemente da espécie, a lesão cutânea ulcerada única é a forma mais comum de apresentação da LC. Normalmente são lesões indolores, de tamanho variável e apresentam formato muito característico, com bordas bem delimitadas e elevadas, fundo granuloso que sangra facilmente, localizando-se preferencialmente, em áreas descobertas como membros inferiores e superiores (Oliveira-Neto, 1998). Formas clínicas atípicas também podem ser encontradas, podendo-se confundir com lesões de outras doenças, como esporotricose, sífilis, hanseníase, tuberculose, infecções por micobactérias e outras (Brasil, 2013; Von Stebut, 2015). Infecções secundárias, principalmente por bactérias podem ocorrer e isso, além de causar dor local, pode produzir modificações no aspecto clássico da lesão.

A persistência parasitária, após a cura clínica é um fato já comprovado na LTA. Episódios como reativação espontânea das lesões (Weigle et al., 1985); transmissão por

transplante de órgãos (Golino et al., 1992); casos de reativação em pacientes imunodeprimidos (Da-Cruz et al., 1992) e encontro do parasito em lesões cicatrizadas por longos períodos (Schubach et al., 1998; Schubach et al., 2001) são elementos que sugerem que cura parasitológica definitiva possa não existir, e que os parasitos possam entrar em equilíbrio com seu hospedeiro. Os fatores que levam a diferentes evoluções e desfechos (cura espontânea, persistência da lesão, recidivas, desenvolvimento da forma mucosa) ainda são um desafio para a Ciência (Mendonça et al., 2004; Vergel et al., 2006).

As lesões cutâneas difusas com aspecto nodular e/ou em placa caracterizam a leishmaniose cutânea difusa (LCD), causada por *L. amazonensis*. Apesar desta espécie ser encontrada em vários estados brasileiros, a LCD é uma forma rara da LTA, associada à alterações na competência imunológica do indivíduo acometido. A doença não responde aos tratamentos convencionais, apresentando um curso crônico e progressivo. Há inicialmente uma lesão única e posterior formação de placas e múltiplas lesões nodulares e não ulceradas pelo corpo. Essa apresentação clínica pode também ser confundida com lesões de outras doenças, como paracoccidiodomicose, carcinomas, hanseníase Virchoviana, entre outras (Silveira et al., 2009; Brasil, 2013).

A LM é causada predominantemente por *L. braziliensis* e se caracteriza por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores, afetando principalmente o nariz, faringe, boca e laringe e possui também diferentes formas, de acordo com o quadro clínico (Brasil, 2013). Classicamente a LM ocorre anos após o surgimento da lesão cutânea, sugerindo uma possível disseminação dos parasitos por via hemática, embora possa ocorrer de forma primária ou concomitante às lesões cutâneas (Arevalo et al., 2007; Ronet et al., 2010; Souza et al., 2010).

Bedoya-Pacheco et al. (2011), estudando a ocorrência da LM no Brasil, verificaram que em regiões onde a incidência de LC foi maior, o número de casos com acometimento

mucoso foi menor. Neste estudo, a proporção de lesões mucosas por região foi: 6,8% para a região Norte; 7,8% para a região Centro-Oeste; 3,7% para a região Nordeste; 10,6% para a região Sudeste; 12,3% para a Região Sul. Em áreas onde a introdução ou reintrodução da *Leishmania* é mais recente, a população parece ser mais suscetível à LM, levantando-se a hipótese de que o contato por maior tempo com o parasito promove maior resistência ao desenvolvimento de lesões mucosas. Apesar do número de casos de LTA ter diminuído em todo o Brasil, como mencionado anteriormente, o número de casos de lesão mucosa não mostrou diminuição importante durante o período 2002-2009, conforme relatado por Bedoya-Pacheco et al. (2011).

Os padrões epidemiológicos da LTA também são variados, em função das características da região geográfica, das espécies de *Leishmania* circulantes e do envolvimento dos vetores e reservatórios. A prevalência da infecção humana também varia em função desses fatores. O estabelecimento desses padrões é fundamental para o controle desse agravo, uma vez que requer estratégias distintas e adequadas ao contexto epidemiológico de cada região (Ferreira et al., 2015). Apesar da prevalência, incidência e expansão geográfica das leishmanioses constituírem um reflexo dessa complexidade, outros fatores podem também ser arrolados nesse contexto. Estudos têm mostrado que a imunidade protetora do indivíduo aumenta de acordo com a permanência na área endêmica. Sugere-se que a exposição às proteínas presentes na saliva do vetor e às inoculações subclínicas do parasito sensibilizem o sistema imunológico para que haja uma resposta protetora maior contra uma infecção em maior grau (Antinori et al., 2005). Outro aspecto que deve ser levado em consideração para explicar a diversidade clínica é o fato de que no Brasil a LTA é causada por pelo menos sete diferentes espécies, entre as quais *L. braziliensis* é considerada de maior prevalência. Atualmente, já é conhecido que a variabilidade genética de *L. braziliensis* é elevada e variada em função da área endêmica (Pacheco et al., 1990; Oliveira

et al., 2013). Por exemplo, na região Sudeste, *L. braziliensis* apresenta um padrão genético homogêneo, revelando a presença e circulação de um único zimodema (Z27) (Ishikawa et al., 2002; Cupolillo et al., 2003). Já nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, diferentes zimodemas de *L. braziliensis* são frequentemente relatados (Cupolillo et al., 2003; Brito et al., 2009).

Em função dessa característica, apresentada por *L. braziliensis*, alguns estudos têm sido realizados na tentativa de correlacionar determinados padrões clínicos com a diversidade genética dessa espécie. Em estudo realizado por Baptista et al. (2009) com pacientes do Rio de Janeiro apresentando padrões clínicos diferenciados, foi observado que embora diferentes perfis genéticos tenham sido detectados, nenhuma associação pode ser feita com a forma clínica. Já no estudo de Schriefer et al. (2009), realizado em Corte de Pedra (BA), onde a variabilidade genética de *L. braziliensis* é maior, foi possível associar padrões clínicos a diferentes subpopulações dessa espécie de *Leishmania*. Com base nessa informação, poderíamos admitir que o padrão genético dos parasitos, circulantes numa dada região, poderia contribuir para o padrão clínico da LTA. Esses dados são importantes, mas não podemos deixar de mencionar que outros fatores, possivelmente relacionados à condição imunológica dos pacientes, possam também interferir no curso clínico da LTA.

Na resposta imune, mediada por células T, os indivíduos podem variar de um estado assintomático a diferentes graus de susceptibilidade à infecção. Isso se dá em função do padrão das citocinas produzidas durante o processo infeccioso, que induzem uma resposta tipo Th1 ou Th2. Na LTA, a imunidade ao parasito é determinada por uma adequada resposta T auxiliar tipo 1, com produção de IFN- γ associada à resposta imune celular, enquanto que a suscetibilidade à doença é mediada por linfócitos T auxiliar tipo 2, com altos níveis de IL-4 e marcada hipergamaglobulinemia decorrente da ativação de linfócitos B (Conceição-Silva et al., 2014).

No centro desse espectro está a forma cutânea localizada (LC), mantida por uma resposta tipo Th1, que confere certa resistência à infecção apresentando bom prognóstico clínico/terapêutico. Nos pólos deste espectro estão as formas não controladas pela resposta imune mediada por células T, a LM, no pólo hiperérgico (excesso de resposta Th1) e a leishmaniose difusa no pólo anérgico (pouca ou nenhuma resposta Th1) (Ribeiro et al., 1998; Bacellar et al., 2002; Silveira et al., 2009). Na LM, ocorre elevada produção de IFN- γ e TNF- α e baixa produção de IL-10 (que inibe a ativação de macrófagos). Estudos *in vitro* mostraram que macrófagos de pacientes com LM possuem baixa capacidade de resposta às citocinas do tipo 2, não havendo inibição da produção de IFN- γ . Esse excesso de resposta, apesar de por um lado provocar injúrias teciduais, por outro, controlam a multiplicação parasitária (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998; Bacellar et al., 2002).

Já na forma difusa da LTA, causada por *L. amazonensis*, ocorre uma anergia celular que promove a proliferação do parasito e agravamento da doença. Os níveis de produção de anticorpos são altos, ocorrendo uma resposta predominantemente tipo 2 (alta produção de IL-10 e baixa de IFN- γ), com isso os macrófagos não são ativados e não conseguem eliminar a infecção. Em decorrência deste quadro imunológico, o prognóstico terapêutico é ruim (Brasil, 2013).

Essa complexidade clínica, característica da LTA, impõe que para um diagnóstico acurado, abordagens laboratoriais devem também ser consideradas. Podem ser empregadas desde ferramentas parasitológicas (exames diretos e cultura); imunológicas (sorologia e teste de Intrademoreção de Montenegro- IDRM), histológicas (coloração pela hematoxilina-eosina - HE, imunohistoquímica) e moleculares, como a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction-Reação em Cadeia da Polimerase).

A confirmação laboratorial por métodos parasitológicos é importante, principalmente devido ao 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. Tanto os fragmentos teciduais quanto os aspirados da borda da lesão podem ser cultivados em meio de cultura à base de ágar sangue, conhecido como meio Novy, McNeal e Nicole (NNN), acrescido de meio líquido Schneider (Basano e Camargo, 2004; Goto e Lindoso, 2010), possibilitando o isolamento e a posterior identificação da espécie (Brasil, 2013).

De acordo com a infraestrutura, ainda podem ser empregadas ferramentas moleculares, baseadas na PCR, que constitui uma técnica com elevada sensibilidade, tornando possível o diagnóstico, principalmente nos casos não resolvidos pelos métodos clássicos (Andrade et al., 2005; Goto e Lindoso, 2010). Apesar das inúmeras vantagens, a PCR ainda não é usada em larga escala no diagnóstico das leishmanioses, pois requer infraestrutura laboratorial adequada e insumos específicos que a torna ainda uma técnica de custo elevado (Fagundes et al., 2010). Características como incapacidade de diferenciar infecção passada e atual, possibilidade de reações positivas na ausência da doença e a dificuldade de formulações de kits comerciais são outras desvantagens do método que restringem seu emprego na rotina laboratorial, sendo mais utilizado em instituições de pesquisa e universidades.

1.2. Tratamento da LTA

O tratamento das leishmanioses ainda é um desafio, principalmente pela pouca opção de medicamentos disponíveis. Apesar do gênero *Leishmania* ter sido descrito em 1903, foi somente em 1912 que Gaspar Vianna introduziu o uso do tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio trivalente) no tratamento pacientes com LTA (Vianna, 1912). Devido aos efeitos secundários graves provocados por este fármaco, outros compostos, como os antimoniais pentavalentes, foram testados, chegando-se ao antimoniato de meglumina, que desde a década de 1940, passou a ser utilizado como fármaco de primeira escolha para o

tratamento das leishmanioses no Brasil. O mecanismo de ação dos antimoniais até hoje não é bem conhecido, mas sabe-se que o fármaco inibe a atividade das vias glicolítica e de oxidação dos ácidos graxos do parasito nas formas amastigotas (Goto e Lindoso, 2010). Embora eficaz, o tratamento com os antimoniais provocam vários efeitos adversos incluindo artralgia, fadiga, náuseas, elevação dos níveis das enzimas hepáticas, anormalidades no eletrocardiograma, entre outros. Por essa razão, nos casos em que há impedimento da utilização destes, outros fármacos como a anfotericina B e a pentamidina podem ser utilizados como tratamento alternativo (Ameen, 2010; Brasil, 2013). No entanto, todos os fármacos empregados no tratamento das leishmanioses sejam os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B ou a pentamidina, são medicamentos que apresentam limitações quanto ao seu emprego, tais como o custo elevado, dificuldade de administração, toxicidade ou ainda o desenvolvimento de possível resistência, o que representa um obstáculo para o sucesso da terapia (Mishra et al., 2007).

De acordo com o manual do MS, o tratamento regular para a forma cutânea é aquele que utilize de 10 a 20mg de antimônio pentavalente (Sb^V) /Kg/dia entre 20 a 30 dias e, para a forma mucosa, o que utilize 20mg Sb^V /Kg/dia entre 30 a 40 dias, ambos sem intervalos superiores a 72h entre as doses (Brasil, 2013).

No Brasil, o antimonial pentavalente disponível é o antimoniato de meglumina, comercializado sob o nome Glucantime® e distribuído gratuitamente pelo MS. Apresenta-se em ampolas de 5mL, contendo 81 mg de antimônio pentavalente (Sb^V) para cada mL, totalizando 405mg de antimônio pentavalente por ampola. As injeções devem ser feitas por vias 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 (Brasil, 2013).

No tratamento de crianças, utiliza-se o mesmo esquema, com dose de 15 mg Sb^V/kg/dia. Caso não haja cicatrização após três meses do término do tratamento, o esquema deverá ser repetido mais uma vez. Se não houver resposta, utiliza-se uma dos fármacos de segunda escolha. As formas mucosas apresentam resposta mais lenta e maior possibilidade de recidiva (Falqueto e Lessa, 1997).

No estado do Rio de Janeiro, mais precisamente no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz), há muitos anos utiliza-se o esquema terapêutico com baixa dose (5mg Sb^V/Kg/dia) de antimoniato de meglumina. Esse esquema é baseado em estudos desenvolvidos no INI, os quais indicam que pacientes submetidos a doses baixas do antimonial apresentam resposta terapêutica similar à dose recomendada pelo MS (20mg) com efeitos adversos reduzidos (Oliveira-Neto et al., 1997a, 1997b; Schubach et al., 2005). Em pacientes com contra-indicação ao esquema contínuo, as aplicações podem ser realizadas em séries de 10 dias, com intervalos equivalentes sem medicação. Em caso de reativação após o término do tratamento, o esquema pode ser repetido (Oliveira-Neto et al., 2000; Schubach et al., 2005). Os resultados obtidos com baixa dose de antimonial pentavalente motivaram a realização de um ensaio clínico no INI, avaliando as doses de 5mg e 20mg, cujos resultados estão sendo divulgados (Lyra, 2013, Saheki, 2013; Terceiro, 2014).

Nesse mesmo Instituto, outros esquemas de tratamento da LC, tal como o esquema intralesional (IL) com antimoniato de meglumina, são também utilizados, principalmente nos casos com contraindicação ao tratamento convencional. Estudo realizado por Vasconcellos et al. (2012), mostrou boa resposta em 83,3% dos pacientes tratados por via IL. Nesse esquema, o antimonial pentavalente foi infiltrado, por via subcutânea, na borda das lesões, realizando-se de 1 a 4 aplicações com intervalo de 15 dias entre elas. A média de volume total de antimonial injetado por lesão foi de 19,7 mL (mediana de 6,5 mL). Um dos resultados importantes observados nesse esquema, foi que além da diminuição dos efeitos

adversos, não houve o desenvolvimento de lesões mucosas por até 60 meses de seguimento pós-tratamento em nenhum dos pacientes tratados. Esse estudo mostrou que doses baixas de antimoniato de meglumina, aplicadas por via IL, não resultaram em aumento do aparecimento de lesões mucosas.

1.3. Falha terapêutica na LTA

Mesmo com elevada eficácia dos antimoniais, razão pela qual ainda é empregado para o tratamento das leishmanioses, observa-se variabilidade de respostas terapêuticas, cujas razões específicas não são totalmente esclarecidas. Admite-se que diferentes fatores possam ter influência nessa resposta tais como: fatores imunológicos dos hospedeiros, fatores dos parasitos, possíveis coinfeções ou mesmo a farmacocinética do antimonial no organismo do hospedeiro (Berman et al., 1982; Berman, 1988; Rodrigues et al., 2006; Romero et al., 2011; Krunchten et al., 2014).

Além da diversidade de resposta terapêutica, casos de falha terapêutica também têm sido cada vez mais relatados em diversas áreas endêmicas do mundo (Ait-Oudhia et al., 2011). De acordo com o MS, a cura da LC é definida pela epitelização das lesões, regressão total da infiltração e eritema, até 3 meses após o término do esquema terapêutico. Quando houver cicatrização progressiva das lesões sem cumprimento dos critérios citados acima, sugere-se observação até seis meses. O critério de cura é clínico, indicando-se acompanhamento regular por 12 meses. A cura das lesões mucosas ocorre com a regressão de todos os sinais, comprovando-se pelo exame otorrinolaringológico, até seis meses após o término do tratamento. O paciente é examinado durante três meses consecutivos após o término do esquema terapêutico para avaliação da cura clínica. Se curado, o paciente deverá ser acompanhado a cada dois meses até completar 12 meses após o tratamento (Brasil, 2013).

De acordo com o manual do MS, é considerado como tratamento irregular os casos que tenham ultrapassado o tempo previsto para um tratamento regular ou que tenha ocorrido um intervalo superior a 72h entre as doses, tanto para a forma cutânea quanto para a forma mucosa.

Ainda, de acordo com o manual do MS (Brasil, 2013), a falha terapêutica é definida quando após dois esquemas terapêuticos regulares, o paciente não tenha apresentado remissão clínica. Já a recidiva, é constituída pelos casos em que ocorre o reaparecimento de lesão em qualquer parte do corpo, no período de até um ano após a cura clínica da lesão primária. A recidiva pode estar ligada ao estado imune do paciente e à forma clínica da doença, no entanto, em áreas endêmicas, a distinção entre reativação e reinfeção nem sempre é uma tarefa simples, havendo a necessidade de estudos genéticos e identificação de subpopulações de parasitos circulantes na área (Oliveira et al., 2013).

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

Apesar das recomendações do MS, diferentes cenários de tratamento são relatados no Brasil, com variados desfechos (Oliveira-Neto et al. 1997a, 1997b; Romero et al., 2001; Teixeira et al., 2008) e a falha terapêutica ao antimonial pentavalente é um deles. Com relação ao antimoniato de meglumina, no Brasil (Rio de Janeiro), foi constatada cerca de 16% de falha terapêutica (Oliveira-Neto, 1997b), na Bolívia cerca de 7% (Bermúdez et al., 2006), na Colômbia em 39% (Palácios et al., 2001) e no Peru em 21,9% (Arevalo et al., 2007). Esses dados sugerem que diferentes percentuais de cura podem ser alcançados, os quais podem estar condicionados a diferentes fatores como mencionado anteriormente, entre eles a espécie de *Leishmania*. Por exemplo, na infecção por *L. guyanensis*, foram relatados

73,7% de casos com falha terapêutica, já na infecção por *L. braziliensis*, foram encontrados cerca de 49,2% (Romero et al., 2001).

Estudos *in vitro* também têm sido realizados buscando-se correlacionar as espécies com a falha terapêutica. Azeredo-Coutinho et al. (2007) mostraram que valores de concentração de inibição média (IC50) para *L. braziliensis* circulantes no Rio de Janeiro foram considerados menores quando comparadas com outras espécies de *Leishmania*. Essa diferença foi significativa, mostrando, através desses ensaios, que *L. braziliensis* responde satisfatoriamente ao antimônio pentavalente no Rio de Janeiro.

Em outro estudo, também em ensaios *in vitro*, avaliaram-se amostras de *L. braziliensis*, comparando simultaneamente a sensibilidade ao Sb^V em isolados obtidos no momento do diagnóstico e antes da introdução do tratamento com isolados obtidos após o primeiro ciclo de tratamento. Os pacientes desse estudo foram tratados com esquema de 5mg Sb^V/Kg/dia e os resultados mostraram que tal esquema terapêutico não induziu a seleção de subpopulações de parasitos resistentes ao Sb^V, sinalizando que outros fatores possam ter tido influência na resposta terapêutica observada nesse grupo (Baptista et al., 2015).

No Rio de Janeiro, a resposta terapêutica ao antimônio de meglumina geralmente é satisfatória, independente do esquema utilizado (Azeredo-Coutinho e Mendonça, 2002; Schubach et al., 2005). Há hipóteses de que essa boa resposta possa ser devido à baixa variabilidade genética dessa espécie circulante na região. De certa forma, explicaria também o sucesso terapêutico observado em casos de LTA nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, onde também ocorre a prevalência do zimodema Z27 de *L. braziliensis* (Oliveira-Neto et al., 2011).

Como mencionado, diversas podem ser as razões para a falha terapêutica na LTA. Tem-se aventado a possibilidade de resistência parasitária ao antimônio pentavalente, sobretudo em casos de leishmaniose visceral nos quais esse fenômeno tem acarretado

consequências mais sérias (Basselin et al., 1997; Sundar et al., 2000; Guerin et al., 2002). Apesar de algumas especulações, não existe ainda um marcador molecular que possa determinar com segurança a resistência dos parasitos do gênero *Leishmania* aos antimoniais (Chakravarty e Sundar, 2010).

Em estudo conduzido por Torres et al (2013), os autores chegaram à conclusão que 4 genes, Aquaporin 1 (AQP1), Heat Shock Protein 70 (hsp70), Multidrug Resistance associated Protein (MRPA) e Trypanothione reductase (TRYR), estavam relacionados com a resistência parasitária e que as amostras de *L. braziliensis* apresentavam maior variabilidade genética intraespécie se comparada às amostras de *L. guyanensis*, dificultando o tratamento. Esses dados corroboram achados sugestivos de que a variabilidade genética de *Leishmania* no estado da Bahia (Nordeste do Brasil) seja maior que no estado do Rio de Janeiro (Sudeste do Brasil) (Cupolillo al., 2003; Schriefer et al., 2004; Baptista et al., 2009), visto que 17 amostras de *L. braziliensis* do estudo eram provenientes da Bahia e apenas 2 do Rio de Janeiro. Dessas 19 amostras, 5 tiveram falha terapêutica, todas provenientes da Bahia.

Outros parâmetros também têm sido levados em consideração para explicar a falha terapêutica na LTA. Em estudo conduzido por Machado et al. (2002) os autores encontraram 47% de falha terapêutica quando o tratamento ocorreu em torno de 5 semanas após o diagnóstico. Neste estudo, os autores concluíram que, ao contrário de outras doenças infecciosas, nas leishmanioses o tratamento quando realizado no estágio inicial da doença (<20 dias de infecção) não seria benéfico em muitos casos. Em outro estudo, avaliando-se possíveis fatores associados à falha ao tratamento da LTA, constatou-se que a cada 10mm a menos na medida do IDRM houve 26% mais chance de ocorrência de falha terapêutica, e indivíduos com menos de 2 meses de evolução da lesão foram 5 vezes mais suscetíveis à falha do tratamento (Antonio et al., 2014). A explicação para os resultados encontrados em ambos os estudos seria que a intervenção terapêutica introduzida antes de se atingir uma

imunidade eficaz induziria a uma resposta inicial não específica e não direcionada totalmente para a eliminação do parasito.

O número de lesões também tem sido um fator associado a um pior desfecho terapêutico da LTA. Alguns estudos mostram que quanto maior número de lesões, maior a probabilidade de falha terapêutica, provavelmente por uma carga parasitária maior (Romero et al., 2001; Yardley et al., 2006). Entretanto, essa variável não teve associação significativa a casos de falha terapêutica no estudo de Antonio et al., (2014) mencionado acima.

Outra abordagem que também vem sendo considerada no contexto da apresentação clínica e no desfecho terapêutico da LTA é a coinfeção por outros patógenos (Delobel et al., 2003; Markle et al., 2004; Matos et al., 2005; Van Den Bogaart et al., 2013; Van Den Bogaart et al., 2014).

De um modo geral, os parasitos possuem uma notável capacidade de suprimir ou desviar a resposta imune do hospedeiro, visando controlar a infecção sem ser eliminado. Alguns parasitos conseguem ter êxito, no entanto, este equilíbrio pode ser desfeito por infecções concomitantes ou imunossupressoras. No caso da co-infecção pelo vírus causador da imunodeficiência humana (HIV), algumas doenças causadas por protozoários (ex: toxoplasmose, criptosporidiose e leishmaniose), podem ter o quadro agravado (Pfaff e Candolfi, 2003). A coinfeção por mais de um agente pode influenciar a resposta imunológica individual para cada espécie, podendo alterar o curso clínico e o tratamento de determinados agravos (Supali et al., 2010).

A coinfeção por parasitos entéricos, apesar de ser um tema ainda muito pouco explorado, tem apresentado significado no contexto da LTA. Os parasitos intestinais, além de elevada prevalência principalmente em regiões menos favorecidas economicamente, estão muitas vezes em sobreposição com as áreas onde ocorrem as leishmanioses (O'Neal et al., 2007). O ambiente imunológico gerado por uma infecção parasitária intestinal pode

interferir com outras condições patológicas, modificando o curso de doenças associadas ou de infecções preexistentes.

Newlove et al. (2011), verificaram que a coinfeção por helmintos intestinais, esteve associada a uma má resposta terapêutica na LC e, mesmo com a introdução precoce de drogas antihelmínticas, as taxas de cura ou o tempo de cura não melhoram. Em outro estudo, foi mostrado que a infecção por helmintos intestinais influencia tanto o curso clínico como a resposta imune na LC, promovendo diminuição da resposta ao antimonial e favorecendo o desenvolvimento de lesões mucosas (O'Neal et al., 2007). Esses dados sugerem que a infecção intestinal nos casos de LTA, sobretudo naqueles com clínica e resposta terapêutica desfavorável, deve ser considerada.

2. JUSTIFICATIVA

A LTA é uma doença infecciosa complexa em vários aspectos. Apresenta diversidade clínica e epidemiológica, que varia em função de diferentes aspectos. Além disso, observa-se variabilidade de resposta à terapêutica, apesar do tratamento ser feito basicamente pelos antimoniais pentavalentes (Brasil, 2013).

Embora a espécie de *Leishmania* possa estar relacionada a determinada apresentação clínica, o padrão da resposta imune celular aos antígenos dos diferentes parasitos também tem sido apontado como um fator influenciador da apresentação e evolução clínica da LTA. Esse fato torna-se um pouco mais complexo já que no Brasil a LTA é causada por pelo menos sete diferentes espécies de *Leishmania* e nem sempre a etiologia é determinada para que o tratamento possa ser estabelecido (Hodiamont et al., 2014). Além disso, temos que considerar o fluxo migratório cada vez mais intenso no mundo, propiciando o deslocamento de parasitos e infecções.

As razões específicas para diversidade clínica e terapêutica na LTA ainda não são totalmente conhecidas e, diversos estudos têm sido conduzidos para esse fim. Um aspecto que ainda tem sido pouco explorado é a possibilidade da coinfeção por outros parasitos, sobretudo os intestinais, na modulação da resposta clínica e terapêutica na LTA.

O Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LaPClinVigiLeish/INI) é um Centro de Referência para o diagnóstico e tratamento da LTA. Esse Centro recebe casos de LTA de diferentes regiões do Brasil, possuindo uma coorte com informações acerca de aspectos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da LTA. Como mencionado anteriormente, alguns aspectos podem estar associados à falha terapêutica observada na LTA, entre os quais podemos citar a espécie de *Leishmania* e a possibilidade de coinfeções.

No LaPClinVigiLeish, utiliza-se a dose de 5mgSb^V/Kg/dia para o tratamento da LTA, baseado numa experiência acumulada há muitos anos, mostrando que tal dose, além de eficaz possui a vantagem de produzir menos efeitos adversos. No entanto, tal esquema ainda não é indicado pelo MS brasileiro, baseado no pressuposto que as diferentes espécies de *Leishmania* possam responder de forma diferenciada ao antimonial pentavalente.

Visando aprofundar a discussão nesse contexto, nosso estudo selecionou pacientes submetidos ao tratamento com antimoniato de meglumina 5mgSb^V/Kg/dia, oriundos de diferentes regiões do Brasil visando responder principalmente a dois questionamentos: i) existe correlação da espécie de *Leishmania* e/ou variabilidade de *L. braziliensis* no desfecho terapêutico? ii) a coinfeção por parasitos intestinais poderia modular a apresentação clínica da LTA e/ou o seu desfecho terapêutico? As respostas a ambos os questionamentos podem trazer ganhos para o conhecimento e manejo terapêutico da LTA.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Verificar se a espécie de *Leishmania* ou a coinfeção por parasitos intestinais podem influenciar o curso clínico e a resposta terapêutica da leishmaniose tegumentar americana, considerando pacientes atendidos no LaPClinVigiLeish (INI/FIOCRUZ) no período de 2000 a 2011, submetidos ao tratamento alternativo com 5 mg Sb^V/Kg/dia de antimoniato de meglumina.

3.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar as espécies de *Leishmania* isoladas dos casos selecionados;
2. Descrever as variáveis clínicas, demográficas, epidemiológicas e de resposta terapêutica ao antimoniato de meglumina
3. Verificar a influência das diferentes espécies de *Leishmania* no curso clínico e na resposta terapêutica, comparando casos de LTA ocorridos no Rio de Janeiro com casos de ocorridos em outros estados do Brasil
4. Verificar a influência da coinfeção por parasitos intestinais no curso clínico e na resposta terapêutica da LTA

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo serão apresentados no formato de artigos científicos, um em fase de publicação e outro já publicado.

Os artigos serão ordenados da seguinte forma:

- Artigo 1: Discute a influência das diferentes espécies de *Leishmaniae*/ou variantes de *L. braziliensis* no curso clínico da LTA, comparando pacientes que adquiriram a infecção no Rio de Janeiro com pacientes que adquiriram a doença em outros estados do Brasil. Todos pacientes utilizaram tratamento com baixa dose de antimoniato de meglumina ($5\text{mgSb}^{\text{V}}/\text{Kg}/\text{dia}$).
- Artigo 2: Avalia a influência de parasitos intestinais no curso clínico da LTA e sua possível associação com a leishmaniose mucosa.

a. **Artigo 1:**

Pacientes infectados por *Leishmania braziliensis* de diferentes regiões brasileiras respondem ao tratamento com 5mg Sb^v/kg/dia de antimoniato de meglumina

Artigo a ser submetido ao periódico Acta Tropica, 2016

Alguns estudos sobre LTA tratam de possíveis fatores capazes de influenciar o tratamento. Um desses fatores seria a existência de diferentes espécies de *Leishmania*. Além disso, há relatos de que a maior variabilidade genética, particularmente de *L. braziliensis*, estaria associada à resposta desfavorável ao tratamento observada em alguns estados brasileiros. No estado do Rio de Janeiro os casos de LTA são causados quase na totalidade por *L. braziliensis*, sendo identificado como uma população geneticamente homogênea, com circulação de um único zimodema (Z27), diferentemente do que ocorre em algumas outras regiões do País.

O Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas recebe casos de diferentes regiões brasileiras e grande parte desses pacientes são tratados com esquema de baixa dose (5mg/Kg/dia) de antimoniato de meglumina. Esse fato possibilitou a realização desse estudo, na tentativa de responder se existe relação entre a espécie de *Leishmania* e/ou variabilidade de *L. braziliensis* com o desfecho terapêutico. Cento e oito casos de LTA foram estudados (72 pacientes que adquiriram a infecção no Rio de Janeiro e 36 que adquiriram a infecção em outros estados do Brasil). *Leishmania braziliensis* foi a espécie prevalente, independente da região de procedência do caso. Duas variantes isoenzimáticas de *L. braziliensis* foram encontradas em pacientes do estado do Amazonas, além de dois pacientes infectados por *L. guyanensis* e um por *L. amazonensis* oriundos dos estados do Amazonas e Maranhão, respectivamente. Dos 108 pacientes, considerando o primeiro curso de tratamento (30 dias), cura foi observada em 78 (72%), dos quais 64 (59%) estavam infectados por *L. braziliensis*, incluindo as duas variantes encontradas no grupo de outros estados. Considerando todos os cursos de tratamentos adicionais com a mesma dose, 88,9% dos pacientes curaram com 5mg Sb^v/Kg/dia. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Ao compararmos a diversidade genética de *L. braziliensis* selecionadas aleatoriamente, confirmamos maior variabilidade para espécies oriundas de outros estados. Os nossos resultados sugerem que o esquema terapêutico empregando baixas doses de antimonial pentavalente poderia ser estendido para outros estados do Brasil. Este artigo responde aos objetivos nº 1 e 2 desta tese

Pacientes infectados por *Leishmania braziliensis* de diferentes regiões brasileiras respondem ao tratamento com 5mg Sb^v/kg/dia de antimoniato de meglumina

Jamyra Iglesias Cataldo^a, Fátima Conceição-Silva^b, Armando de Oliveira Schubach^a, Mauro Célio de Almeida Marzochi^a, Cláudia Maria Valete-Rosalino^{a,e}, Maria Inês Fernandes Pimentel^a, Marcelo Rosandiski Lyra^a, Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira^c, Juliana Helena da S. Barros^d, Raquel da Silva Pacheco^a, Maria de Fátima Madeira^{a,*}

^a Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses/Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) – Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

^b Laboratório de Imunoparasitologia/Instituto Oswaldo Cruz (IOC) – Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil

^c Laboratório de Epidemiologia Clínica/Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) - Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil

^d Laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos/Instituto Oswaldo Cruz (IOC) – Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil

^e Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia/ Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil

*Autor correspondente. Tel.: +55 21 38659541. Endereço de E-mail: fatima.madeira@ini.fiocruz.br (M.F. Madeira)

RESUMO

No Brasil, a leishmaniose tegumentar (LT) pode ser causada por sete diferentes espécies de *Leishmania*, as quais podem ter influência no curso clínico da doença e na resposta terapêutica. Neste estudo, buscamos verificar se a espécie de *Leishmania* poderia influenciar o desfecho do tratamento com antimoniato de meglumina na dose de 5mg de antimônio Sb^v/kg/dia. Com esse objetivo, compararam-se casos provenientes do estado do Rio de Janeiro, onde *Leishmania braziliensis* é a espécie prevalente, com casos oriundos de outros estados brasileiros, onde também circulam outras espécies de *Leishmania*. A população do estudo foi composta por 108 pacientes, 36 pacientes que adquiriram a LT em outros estados do Brasil (grupo OE) e 72 pacientes infectados estado do Rio de Janeiro (grupo RJ). *Leishmania braziliensis* foi identificada em 100% dos pacientes do grupo RJ. Já no grupo OE, *Leishmania braziliensis* foi identificada em 18 (86%) dos 21 isolados, incluindo duas variantes isoenzimáticas. Nesse grupo, *Leishmania amazonensis* foi identificada em um paciente e *Leishmania guyanensis* em dois. A análise de 12 amostras de *Leishmania braziliensis* escolhidas aleatoriamente permitiu verificar que as cepas do grupo OE apresentaram variabilidade genética maior quando comparadas às do RJ. Dos 108 pacientes estudados, 72% evoluíram para cura no primeiro tratamento com antimoniato de meglumina (5mg Sb^v/Kg/dia). Considerando tratamentos adicionais com a mesma dose, 88,9% dos pacientes curaram com 5mg Sb^v/Kg/dia. *Leishmania braziliensis* de diferentes regiões do Brasil responderam satisfatoriamente ao tratamento com antimoniato de meglumina (5mg Sb^v/Kg/dia) sem diferença entre os grupos, sugerindo que a resposta ao tratamento alternativo com esta dose de antimonial não esteja relacionada a maior ou menor variabilidade genética e que tal esquema terapêutico possa ser utilizado em outras regiões, além do Rio de Janeiro. Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*, Variabilidade genética, Tratamento, Antimoniato de meglumina

1. Introdução

As leishmanioses constituem grupos de doenças complexas, causadas por diferentes espécies de *Leishmania*. São doenças de difícil controle e negligenciadas, que ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Alvar et al., 2012; MS, 2013; Stolk et al., 2016).

Na infecção humana, as leishmanioses podem se apresentar como doenças com acometimento tegumentar (cutânea localizada, cutânea disseminada, cutânea difusa, cutaneomucosa e mucosa) ou com acometimento visceral (leishmaniose visceral - LV), dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e também do tipo de resposta imune apresentada pelo hospedeiro. No Brasil, sete espécies podem causar a leishmaniose tegumentar (LT), sendo *Leishmania braziliensis* a espécie mais prevalente (Marzochi and Marzochi, 1994; MS, 2013; De Vries et al., 2015). O Brasil tem seu território dividido em cinco regiões geográficas e a LT pode apresentar diferentes padrões epidemiológicos em cada uma delas. A região Norte é a que apresenta o maior número de casos da doença, seguida pela região centro-oeste e região nordeste (Pontello Junior et al., 2013). Na região norte, a LT possui reservatórios e vetores bem definidos e o ser humano é um hospedeiro acidental (Camara Coelho et al., 2011; Guerra et al., 2015). *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* são as principais espécies causadoras da LT nessa região. Alguns estudos reportam *Leishmania braziliensis* em 55% dos casos de LT na região Amazônica e em 95% dos casos de LT fora da região Amazônica (Tojal et al., 2006; Brito et al., 2009). Outros estudos indicam que nos estados de Amazonas, Amapá, Roraima e Pará, *Leishmania guyanensis* é o principal agente etiológico da doença, sendo associado com mais de 50% das leishmanioses humanas registradas para toda região Amazônica brasileira (Romero et al., 2002; Figueira et al., 2013). *Leishmania amazonensis* é menos frequente em toda a região (Camara Coelho et al., 2011).

Já no sudeste brasileiro, a LT é causada principalmente por *Leishmania braziliensis* com casos descritos em regiões sem florestas primárias, sem reservatórios bem definidos e com animais domésticos infectados como hospedeiros acidentais. Um exemplo é o estado do Rio de Janeiro onde a transmissão ocorre num padrão domiciliar ou peridomiciliar, dependente da adaptação do vetor ao peridomicílio (Marzochi and Marzochi, 1994 ; Oliveira-Neto et al., 2000). Na região Centro-Oeste a LT foi considerada por muitos anos uma doença ocupacional, afetando homens adultos expostos a regiões de florestas. Atualmente, a LT está em processo de urbanização e de expansão geográfica nessa região, com aumento no número de casos em mulheres e crianças (Couto et al., 2014). Na região Sul, a LT foi descrita há poucas décadas e o estado do Paraná conta com 94% dos casos da região (Baum et al., 2013). Na região Nordeste, a transmissão está associada com resquícios de Mata Atlântica, onde os vetores e reservatórios se adaptaram a ambientes modificados, causando transmissão peridomiciliar (Pinheiro et al., 2013).

A resposta ao tratamento da LT pode variar em função do estado imunológico do hospedeiro, de fatores relacionados ao parasito e possíveis coinfeções (Croft et al., 2001; Romero et al., 2001; Torres et al., 2013; Van DenBogaart et al., 2014). No Brasil, recomenda-se o antimoniato de meglumina na dose de 10 a 20 mg do antimônio pentavalente (Sb^V)/Kg/dia, por 20 dias para a forma cutânea e 20 mg Sb^V /Kg/dia por 30 dias para a forma mucosa. Apesar da sua efetividade, é relatada uma variedade de efeitos adversos ao tratamento (Tuon et al., 2008; MS, 2013). No Rio de Janeiro, nos últimos 30 anos, o antimoniato de meglumina vem sendo utilizado na dose de 5 mg Sb^V /kg/dia com taxas de cura de 80 a 100% e menos efeitos adversos (Oliveira-Neto et al., 1996; Oliveira-Neto et al., 1997; Schubach et al., 2005; Vasconcellos et al., 2010).

No Brasil, existem diferentes cenários de resposta aos antimoniais pentavalentes, possivelmente relacionados à espécie de *Leishmania* envolvida (Oliveira-Neto et al., 1997,

Romero et al., 2001; Teixeira et al., 2008). Adicionalmente, as possíveis variações genéticas encontradas numa mesma espécie poderiam explicar a diversidade de respostas terapêuticas (Kuhls et al., 2013). Por exemplo, no Rio de Janeiro e Espírito Santo, a boa resposta ao tratamento poderia ser explicada pela homogeneidade genética de *Leishmania braziliensis* (Cupolillo et al., 2003; Baptista et al., 2009). Em outras regiões do Brasil, a heterogeneidade desta espécie poderia influenciar na resposta ao tratamento (Schriefer et al., 2004; Azeredo-Coutinho et al., 2007; Kuhls et al., 2013).

Apesar dos bons resultados verificados, a experiência com doses baixas de antimoniato de meglumina ainda é restrita ao Rio de Janeiro. Neste estudo, comparou-se a resposta ao tratamento com antimoniato de meglumina 5mg Sb^v/Kg/dia de pacientes provenientes do estado do Rio de Janeiro com pacientes de outros estados, a fim de verificar se a espécie de *Leishmania* ou a variabilidade genética de *Leishmania braziliensis* poderia influenciar na resposta ao tratamento.

2. Materiais e métodos

2.1 População de estudo e critérios de seleção

Foi realizado um estudo com amostras de conveniência, no qual foram incluídos 36 pacientes (de um total de 87) diagnosticados com LT adquirida em outros estados (grupo OE) do Brasil, exceto o estado do RJ, atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ) no período de 2000 a 2011 e tratados com antimoniato de meglumina por via intramuscular (5mg Sb^v/Kg/dia) por 30 dias consecutivos ou em três séries intermitentes de 10 dias de tratamento intercaladas com 10 dias de intervalo. Os pacientes com a forma mucosa foram tratados por um mínimo de 30 dias e máximo de 120 dias, de forma continuada ou em séries de 10 dias de tratamento com 10 dias de intervalo, até a epiteliação e desinfiltração das mucosas. Alguns pacientes foram excluídos do estudo

por apresentarem estado provável de aquisição da infecção indefinido ou por terem retornado ao seu estado de origem durante o tratamento, não concluindo-o no INI/Fiocruz. Os pacientes tiveram confirmação diagnóstica por cultura positiva para *Leishmania* cujos isolados se mantinham criopreservados, por visualização das formas amastigotas na histopatologia ou por detecção de DNA do parasito por PCR.

O grupo do Rio de Janeiro (grupo RJ), constituído por 72 pacientes, foi selecionado randomicamente entre os pacientes que preenchiam os mesmos critérios de inclusão, exceto por terem adquirido a infecção no estado do Rio de Janeiro. Os dados clínicos e a história clínica dos pacientes foram acessados nos prontuários médicos.

Cura foi definida como: completa epitelização e desaparecimento de crostas, descamação, infiltração e eritema sem recorrência dentro de um ano após o tratamento. Má resposta foi definida como ausência de cura progressiva da lesão após o término do tratamento e reativação foi definida como reaparecimento da lesão após o tratamento inicial, aparentemente bem sucedido.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INI/FIOCRUZ sob o número 18473213.5.0000.5262 e todos os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

2.2 Identificação das amostras de *Leishmania*

A técnica de Eletroforese de Enzimas Multilocus (MLEE) foi utilizada para identificação da espécie de *Leishmania*. Utilizamos cinco sistemas enzimáticos de acordo com Cupolillo et al. (1994): 6PGDH (6-phosphogluconate dehydrogenase, EC.1.1.1.43); GPI (phosphoglucose isomerase, EC.5.3.1.9); NH (nucleoside hydrolase, 2 locus, EC. 3.2.2.1); G6PDH (Glucose-6-phosphate dehydrogenase, EC.1.1.1.49) and ME (Malic Enzyme, EC. 1.4.1.9) (Sigma, Steinheim, Germany). Considerando a maioria das espécies

dermotrópicas no Brasil, *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), que constituem amostras de referência, foram usadas como controles em todas as corridas eletroforéticas.

2.3 Avaliação da heterogeneidade da região do ITS2 de *Leishmania braziliensis*

Esta abordagem foi realizada através dos ensaios de PCR e posterior sequenciamento dos produtos amplificados, visando comparar amostras de *Leishmania braziliensis* isoladas de pacientes do RJ, com amostras de *Leishmania braziliensis* isoladas de pacientes do grupo OE. Tais amostras foram selecionadas aleatoriamente e o DNA foi extraído de formas promastigotas de cultura, usando kit DNAzol (Invitrogen, Life Sciences, USA) de acordo com instruções do fabricante. Após esse procedimento, o DNA foi estocado a -20°C até a utilização nos ensaios.

O ensaio de PCR foi direcionado para a região do ITS2 do DNA ribossomal, utilizando os iniciadores IR2 (5'-GCGGGTAGTCCI'GCCAAACACTCAGGTCTG) e L5.8SR (5'-AAGTGCGATAAGTGGTA-3'), gerando um produto de 750 pares de base (pb). Para a PCR, o volume total da mistura por reação foi 25 μl , usando 10 pmol/ μl para cada primer, 0,2mM de cada deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 3mM MgCl_2 , e 1U de AmpliTaq Gold[®] PCR polymerase (Applied Biosystems). A PCR foi realizada usando a seguinte estrutura de ciclos: 95°C por 10 min, seguido por 33 ciclos de 95°C por 20 s, 53°C por 30 s e 72°C por 1 min, com uma extensão final de 72°C por 6 min. Todos os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel agarose a 2%. Além disso, todos os produtos da PCR foram purificados usando o Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Crawley, Reino Unido) seguindo instruções do fabricante para o sequenciamento.

O sequenciamento do DNA e todas as sequências de nucleotídeos foram determinados usando um sequenciador automático (3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems). Todas as

sequências de nucleotídeos obtidas para o alvo molecular foram alinhadas e comparadas usando o programa Mega versão 6.0 (Tamura et al. 2011). O mesmo programa foi usado para estimar a divergência genética entre as sequências para pacientes dos grupos RJ e OE gerados com base no algoritmo de Tamura-Nei, usando taxas uniformes e uma deleção parcial de 95%.

2.4 Análise dos Resultados

A análise exploratória dos dados foi realizada pela descrição de frequências das variáveis qualitativas (gênero, espécie de *Leishmania*, forma clínica e localização de lesões) e quantitativas (número de lesões e tempo de evolução das lesões), além de medidas-resumo (médias, mínimo e máximo) da idade e tempo de tratamento.

O teste de independência do qui-quadrado e teste exato de Fisher, no caso de tabelas 2x2 ou com contagens esperadas <5, foram utilizados para verificar a associação de fatores demográficos, clínicos e terapêuticos com a região de procedência dos pacientes (RJ x OE groups). No caso da associação de idade com o ou grupo foi empregado o teste T, visto que o teste de Kolmogorv-Smirnov não rejeitou a hipótese de normalidade ao nível de 5% de significância.

Para a análise dos dados foi utilizado o software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 16.0. P-valores <0,05 nos testes foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

3.1 População de estudo

Dos 72 pacientes do RJ, 62,4% eram do gênero masculino e a média de idade foi de 35 anos (mínimo 5 meses e máximo 75 anos). Dos 36 pacientes do grupo OE 72,2% eram do

gênero masculino e a média de idade foi de 41,5 anos (mínimo 8 e máximo 80 anos). Não foi encontrada significância estatística quanto à diferença de idade e sexo entre os grupos RJ e OE ($p=0,112$ e $p=0,826$, respectivamente). A maioria dos pacientes do RJ era proveniente do município do Rio de Janeiro (58,3%). Do grupo OE, 42% eram da Região Norte (9 do Amazonas, 4 do Pará, 1 de Rondônia e 1 de Roraima), 33% da Região Nordeste (3 do Ceará, 3 da Bahia, 2 do Maranhão, 1 da Paraíba, 1 de Pernambuco, 1 de Sergipe e 1 paciente tinha como possível área endêmica os estados de Alagoas ou Ceará), 22% eram da Região Sudeste (7 de Minas Gerais e 1 do Espírito Santo) e 3% eram da Região Centro-Oeste (1 de Goiás).

Quanto à ocupação, 83% dos pacientes do RJ exerciam atividades urbanas, 7% eram trabalhadores rurais, 3% militares e 7% ignoradas. No grupo OE, 67% dos pacientes exerciam ocupações urbanas, 11% eram trabalhadores rurais, 19% eram militares e 3% ignoradas.

A apresentação clínica mais frequente foi leishmaniose cutânea (LC=73%), seguida por leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM= 14%) e leishmaniose mucosa (LM=13%). Quarenta e quatro (41%) pacientes com leishmaniose cutânea apresentaram lesão cutânea única, afetando os membros inferiores. O tempo de evolução das lesões cutâneas foi inferior a 3 meses para 65% dos pacientes. A mucosa nasal foi o sítio mais acometido em 59% dos casos com envolvimento mucoso.

3.2 Identificação etiológica das espécies

Leishmania braziliensis foi identificada em 100% dos pacientes do grupo RJ, classificadas no Zimodema Z27 (Cupolillo et al., 2003). Nenhuma variante isoenzimática foi detectada nas amostras desse grupo.

No grupo OE a identificação foi possível em 58% ($n=21$) dos pacientes. Nesse grupo, *Leishmania amazonensis* foi identificada em 1 paciente do estado do Maranhão e

Leishmania guyanensis foi identificada em 2 casos oriundos do estado do Amazonas. *Leishmania braziliensis* foi identificada em 18 (86%) dos 21 pacientes, dos quais 7 foram oriundos da Região Norte (4 do Amazonas, 1 de Rondônia, 1 de Roraima e 1 do Pará), 6 da Região Nordeste (3 da Bahia, 1 do Ceará, 1 do Maranhão e 1 com área endêmica provável em Alagoas ou Ceará), 4 da Região Sudeste (todos de Minas Gerais) e 1 da Região Centro-Oeste (Goiás). Entre as 18 amostras identificadas como *Leishmania braziliensis*, 16 apresentaram padrão isoenzimático Z27 e 2 amostras apresentaram variações nos sistemas enzimáticos ME, 6PGDH e GPI, em relação à referência de *Leishmania braziliensis*, porém, idênticas entre si. Ambos os casos foram oriundos do estado do Amazonas.

Dos 29 pacientes com envolvimento mucoso (14 do RJ e 15 do grupo OE), todos os 20 isolados foram identificados como *Leishmania braziliensis*.

A amplificação da região do ITS foi realizada em 12 (13%, n=90) amostras de *Leishmania braziliensis* (8 do grupo RJ e 4 do grupo OE) resultando em bandas de cerca de 750 bp para todas as amostras. Por comparação com sequências depositadas no banco de dados GenBank a identidade da espécie *Leishmania braziliensis* foi confirmada para essas amostras, incluindo as 2 variantes detectadas por isoenzimas.

As estimativas de divergência evolutiva média entre as sequências de nucleotídeos revelaram que as amostras de *Leishmania braziliensis* avaliadas apresentaram baixa diversidade genética intraespecífica (0.006) quando comparadas todas as 12 sequências. As estimativas de divergência evolutiva média ao longo de pares de sequências dentro dos grupos de *Leishmania braziliensis* do RJ e *Leishmania braziliensis* de OE foi 0,001793 e 0,006162, respectivamente.

3.3 Desfecho Terapêutico

Dos 108 pacientes estudados, 72% evoluíram para cura no primeiro curso de tratamento com antimoniato de meglumina (5mg Sb^V/Kg/dia). Considerando todos os cursos de tratamentos adicionais com a mesma dose, 88,9% dos pacientes curaram com 5mg Sb^V/Kg/dia. Dos 29 pacientes com envolvimento mucoso, 69% curaram no primeiro curso de tratamento com 5mg Sb^V/Kg/dia e 86% curaram com 1 ou 2 cursos de tratamentos adicionais com a mesma dose. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos RJ e OE. Três pacientes do RJ group (4,2%) abandonaram o tratamento. Os esquemas terapêuticos utilizados em cada tratamento, os desfechos terapêuticos e a espécie de *Leishmania* envolvida são mostrados na Figura. As repetições de tratamento foram realizadas nos 19 (18%) pacientes que evoluíram com reativação das lesões (tempo médio = 7 meses) e nos 10 (9%) pacientes que evoluíram com má resposta inicial ao tratamento. O tempo de duração de tratamento desses pacientes foi em média 3 meses (mínimo de 1 mês e máximo de 13 meses). Nenhuma variável estudada teve influência no desfecho terapêutico dentro dos grupos estudados (Tabela).

4. Discussão

Este estudo foi conduzido objetivando investigar se diferentes espécies de *Leishmania* e subpopulações de *Leishmania braziliensis* poderiam influenciar a resposta terapêutica com antimoniato de meglumina na dose de 5mg Sb^V/Kg/dia, comparando casos de LT ocorridos no Rio de Janeiro com casos ocorridos em diferentes estados brasileiros.

Leishmania braziliensis foi identificada em 100% das amostras do grupo RJ e em 86% das amostras identificadas no grupo OE. *Leishmania amazonensis* (1 caso) e *Leishmania guyanensis* (2 casos) foram isoladas de pacientes que contraíram a infecção nos estados do Maranhão e do Amazonas, respectivamente, corroborando dados epidemiológicos dessas regiões (Vieira-Gonçalves et al., 2008; Baptista et al., 2009; MS, 2013; Araujo et al., 2015).

É discutido se as diferentes espécies de *Leishmania* respondem de forma diferenciada ao tratamento pelos antimoniais pentavalentes (Romero et al., 2001; Rodrigues et al., 2006). No presente estudo, dos 90 pacientes infectados por *Leishmania braziliensis*, 71% evoluíram para cura no primeiro curso de tratamento e 15% no segundo curso de tratamento com dose de antimonial pentavalente de 5 mg Sb^V/Kg/dia. É interessante destacar que entre as amostras de *Leishmania braziliensis* analisadas neste estudo, 2 variantes isoenzimáticas foram identificadas no grupo OE. Esse dado mostra maior nível de heterogeneidade genética neste grupo em comparação com amostras de *Leishmania braziliensis* do grupo RJ, que mostrou uma estrutura populacional homogênea. Além disso, maior variabilidade genética também foi encontrada em amostras do grupo OE, quando comparadas às amostras do grupo RJ, analisando-se a região ITS do DNA de 12 isolados de *Leishmania braziliensis*.

É discutido se a variabilidade genética, encontrada em subpopulações de *Leishmania braziliensis* poderia ser um fator importante no desfecho terapêutico (Torres et al., 2010; Rojas et al., 2010). Nossos resultados e outros estudos (Ishikawa et al., 2002; Cupolillo et al., 2003; Baptista et al. 2009; Oliveira et al., 2013) indicam que a população de *Leishmania braziliensis* que circula no estado do Rio de Janeiro apresenta um padrão genético homogêneo, com baixa variabilidade, fato que ajudaria a explicar a boa resposta terapêutica relatada nessa região quando comparada às regiões onde circulam diferentes zimodemas (Kuhls et al., 2013). A resposta terapêutica ao antimonial pentavalente costuma ser mais variada em regiões fora do estado do Rio de Janeiro, onde circulam outras espécies de *Leishmania* e há maior variabilidade genética de *Leishmania braziliensis* (Oliveira-Neto et al., 1997; Romero et al., 2001; Schubach et al., 2005; Teixeira et al., 2008). Entretanto, nossos resultados sugerem que, independente da origem geográfica ou variabilidade genética, casos provocados por *Leishmania braziliensis* podem responder ao tratamento com baixa dose de antimoniato de meglumina.

A presença de lesão cutânea única foi prevalente nos casos estudados (79%), de acordo com os padrões clínicos clássicos característicos da LT causada por *Leishmania braziliensis* no Brasil.

Acredita-se que a forma mucosa seja uma manifestação metastática da LT (Castellucci et al., 2005). Neste estudo, *Leishmania braziliensis* foi a única espécie identificada nos pacientes com envolvimento mucoso. Esta espécie é a principal responsável pela forma mucocutânea na América do Sul, levando ao desenvolvimento de 4 a 5 % desses casos dentre o total de casos de LTA (Amato et al., 2008). Neste estudo, o número de pacientes com envolvimento mucoso foi semelhante entre os grupos RJ e OE sugerindo ausência de relação entre a presença de lesões mucosas e a maior ou menor variabilidade genética de *Leishmania braziliensis*. Estudos anteriores realizados no Rio de Janeiro observaram ausência de correlação entre padrões genotípicos de *Leishmania* e manifestação clínica (Baptista et al., 2009).

Diferentes formas clínicas de LT, causadas por *Leishmania braziliensis*, foram associadas a diferentes subpopulações, distribuídas em diferentes locais do estado da Bahia (Schrieferet al. 2009). Segundo os autores, diferenças significativas foram observadas na distribuição espacial de LM e leishmaniose disseminada, observando-se concordância com a distribuição da doença e genótipos de *Leishmania braziliensis* associados a elas. Os 3 casos aqui estudados, oriundos da Bahia, foram causados por *Leishmania braziliensis*, tendo um, apresentado lesão mucosa e os outros dois lesão cutânea localizada. Não foi verificada variação isoenzimática nestes isolados em relação à cepa referência de *Leishmania braziliensis*.

A utilização do esquema alternativo de antimonial pentavalente também mostrou-se eficaz no tratamento da LM, diferente do indicado na literatura (MS, 2013). Dos 29 casos deste estudo que apresentaram envolvimento mucoso, 69% apresentaram cura no primeiro

curso de tratamento com 5mg Sb^V/Kg/dia e 86% responderam a cursos de tratamentos adicionais com a mesma dose. No acometimento mucoso, a dose de medicamento recomendada é de 20mg Sb^V/kg/dia, por 30 dias e, nesta dosagem, o antimonial pode atingir seu limiar de toxicidade e provocar efeitos adversos que levem a suspensão do tratamento (MS, 2013). O uso do antimonial na dose de 5mg Sb^V/Kg/dia promove a diminuição dos efeitos adversos, sem maior prejuízo da eficácia desse esquema (Oliveira-Neto et. al., 1996; Oliveira-Neto et.al., 1997; Schubach et. al., 2005).

De acordo com a literatura, a eficiência do antimoniato de meglumina para *L. guyanensis* pode variar de 26,3% (Romero et al., 2001) a 81,6% (Talhari et al., 1985) e apesar do antimonial ser a primeira droga de escolha para o tratamento da LT no Brasil, na região amazônica, a pentamidina tem sido a droga eleita para o tratamento de pacientes infectados com esta espécie (Talhari et al., 1988; Gadelha et al., 2015). Dos dois pacientes infectados por *Leishmania guyanensis* e com má resposta ao primeiro curso de tratamento, um evoluiu para cura após o segundo tratamento com 5mg Sb^V/kg/dia, apesar da esperada má resposta dessa espécie aos antimoniais (Couto et al., 2014). Desta forma, a realização de um estudo multicêntrico para verificar a resposta de pacientes infectados por *L. guyanensis* ao tratamento alternativo com 5 mg Sb^V/Kg/dia seria interessante, visto que o custo de tratamento com a Pentamidina é maior se comparado aos antimoniais (Ourives-Neves et al., 2011).

O único paciente infectado por *Leishmania amazonensis* deste estudo apresentou a forma cutânea clássica, com lesão única, que geralmente responde de forma satisfatória ao antimonial (Schubach et al., 2005), evoluindo para cura no primeiro curso de tratamento.

Os três pacientes do Rio de Janeiro que abandonaram o tratamento obtiveram má resposta terapêutica do primeiro até o quarto curso de tratamento, utilizando diferentes esquemas e drogas, não obtendo cura. Provavelmente, por esta razão, não retornaram para

continuar o tratamento. Desses pacientes um era portador do vírus HIV e apresentava tuberculose intestinal, outro era uma criança de 9 anos e o outro uma paciente que desenvolveu pancreatite com o uso da anfotericina B.

No geral, se considerarmos os resultados dos 108 pacientes, 87% evoluíram para cura com antimoniato de meglumina na dose de 5mg Sb^v/kg/dia com até dois cursos de tratamento, sendo importante lembrar que o critério de falha terapêutica proposto pelo MS envolve dois esquemas regulares consecutivos (MS, 2013).

Em resumo, este estudo mostrou evidências de que pacientes infectados por *Leishmania braziliensis* cuja infecção foi adquirida em diferentes regiões do Brasil podem responder de forma satisfatória ao tratamento com antimoniato de meglumina utilizando o esquema com 5mg Sb^v/kg/dia. Sugere-se que a resposta terapêutica não esteja relacionada unicamente a maior ou menor variabilidade genética ou espécie envolvida na infecção e que tal esquema terapêutico possa ser utilizado em outras regiões, além do Rio de Janeiro.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não têm conflito de interesse.

Agradecimentos

Esta pesquisa constitui parte da tese de doutorado em pesquisa clínica em doenças infecciosas de Jamyra Iglesias Cataldo no Programa do Instituto Nacional de Infectologia (INI) Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

O presente estudo foi parcialmente financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, processo nº485333/2013-9) e FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – Programa Jovem Cientista do nosso Estado, processo E26-201.537/2014 e Cientista do nosso Estado, processo E26-

202.011/2015). Maria de Fatima Madeira, Armando de Oliveira Schubach e Mauro Marzochi são bolsistas de produtividade do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Referências

- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M.; WHO Leishmaniasis Control Team., 2012. Leishmaniasis world wide and global estimates of its incidence. PLoS One 7, e35671.
- Amato, V.S., Tuon, F.F., Bacha, H.A., Neto, V.A., Nicodemo, A.C., 2008. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. Acta Trop. Jan;105(1):1-9.
- Araujo, F.J.d., Silva, L.D.O.d., Mesquita, T.G., Pinheiro, S.K., Vital, W.d.S., Chrusciak-Talhari, A., Guerra, J.A., Talhari, S., Ramasawmy, R., 2015. Polymorphisms in the *TOLLIP* Gene Influence Susceptibility to Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania guyanensis* in the Amazonas State of Brazil. PLoS Negl. Trop. Dis. 9, e0003875.
- Arevalo, J., Ramirez, L., Adai, V., Zimic, M., Tulliano, G., Miranda-Verástegui, C., Lazo, M., Loayza-Muro, R., DeDoncker, S., Maurer, A., Chappuis, F., Dujardin, J.C., Llanos-Cuentas, A., 2007. Influence of *Leishmania* (Viannia) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. J. Infect. Dis. 15, 1846-51.
- Azeredo-Coutinho, R.B.G., Conceição-Silva, F., Schubach, A., Cupolillo, E., Quintella, L.P., Madeira, M.F., Pacheco, R.S., Valette-Rosalino, C.M., Mendonça, S.C.F., 2007. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 50, 157-60.
- Baum, M., Ribeiro, M.C., Lorosa, E.S., Damasio, G.A., Castro, E.A., 2013. Eclectic feeding behavior of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the transmission area of American cutaneous leishmaniasis, state of Paraná, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 46, 560-5.
- Baptista, C., Miranda, L.deF., Madeira, M.deF., Leon, L.L., Conceição-Silva, F., Schubach, A.de O., 2015. In vitro sensitivity of paired *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* samples isolated before meglumine antimoniate treatment and after treatment failure or reactivation of cutaneous leishmaniasis. Dis. Markers 2015, 943236.

- Baptista, C., Schubach, A.O., Madeira, M.F., Leal, C.A., Pires, M.Q., Oliveira, F.S., Conceição-Silva, F., Rosalino, C.M., Salgueiro, M.M., Pacheco, R.S., 2009. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Exp. Parasitol.* 121, 317-22.
- Bedoya-Pacheco, S.J., Araujo-Melo, M.H., Valete-Rosalino, C.M., Pimentel, M.I., Conceição-Silva, F., Schubach, A.O., Marzochi, M.C., 2011. Endemic tegumentary leishmaniasis in Brazil: correlation between level of endemicity and number of cases of mucosal disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84, 901-5.
- Bourreau, E., Ginouves, M., Prévot, G., Hartley, M.A., Gangneux, J.P., Robert-Gangneux, F., Dufour, J., Sainte-Marie, D., Bertolotti, A., Pratlong, F., Martin, R., Schütz, F., Couppié, P., Fasel, N., Ronet, C., 2015. Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania guyanensis* Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse. *J. Infect. Dis.* 29, 1-7.
- Brito, M.E., Andrade, M.S., Mendonça, M.G., Silva, C.J., Almeida, E.L., Lima, B.S., Félix, S.M., Abath, F.G., da Graça, G.C., Porrozzi, R., Ishikawa, E.A., Shaw, J.J., Cupolillo, E., Brandão-Filho, S.P., 2009. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Trop. Med. Int. Health* 14, 1278-1286.
- Camara Coelho, L.I., Paes, M., Guerra, J.A., Barbosa, Md., Coelho, C., Lima, B., Brito, M.E., Brandão Filho, S.P., 2011. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol. Res.* 108, 671-7.
- Cantanhêde, L.M., da Silva Júnior, C.F., Ito, M.M., Felipin, K.P., Nicolete, R., Salcedo, J.M., Porrozzi, R., Cupolillo, E., Ferreira, RdeG., 2015. Further Evidence of an Association between the Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0004079.
- Castellucci, L., Cheng, L.H., Araújo, C., Guimarães, L.H., Lessa, H., Machado, P., Almeida, M.F., Oliveira, A., Ko, A., Johnson, W.D., Wilson, M.E., Carvalho, E.M., DE Jesus, A.R., 2005. Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* Jul;73(1):69-73.
- Couto, D.V., Hans Filho, G., Medeiros, M.Z., Vicari, C.F., Barbosa, A.B., Takita, L.C., 2014. American tegumentary leishmaniasis- a case of therapeutic challenge. *An. Bras. Dermatol.* 89, 974-6.
- Cupolillo, E., Brahin, L.R., Toaldo, C.B., de Oliveira-Neto, M.P., de Brito, M.E., Falqueto, A., de Farias Naiff, M., Grimaldi, G. Jr., 2003. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3126-3132.
- Vasconcellos, E.F.C., de Oliveira Schubach, A., Valete-Rosalino, C.M., de Souza Coutinho, R., Conceição-Silva, F., de Matos Salgueiro, M., Rosandiski Lyra, M., Soares Moreira, J., Azeredo-Coutinho, R.B., Fernandes Pimentel, M.I., Roberto Mortari, S., de Fátima Madeira, M., Pereira Quintella, L., Baptista, C., de Almeida Marzochi, M.C., 2010. American tegumentary leishmaniasis in older adults: 44 cases treated with an intermittent low-dose antimonial schedule in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Am. Geriatr. Soc.* 58, 614-6.
- De Lima, A.C., Zampieri, R.A., Tomokane, T.Y., Laurenti, M.D., Silveira, F.T., Corbett, C.E., Floeter-Winter, L.M., Gomes, C.M., 2011. *Leishmania* sp. identification by PCR

- associated with sequencing of target SSU rDNA in paraffin-embedded skin samples stored for more than 30 years. *Parasitol. Res.* 108, 1525-31.
- De Vries, H.J.C., Reedijk, S.H., Schallig, H.D.F.H., 2015. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *Am. J. Clin. Dermatol.* 16, 99-109.
- Figueira, E.A.G., Silva, G., Chagas, E.C.S., Shimabukuro, P.H.F., 2013. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from Lábrea, state of Amazonas, Brazil, with a description of *Evandromyia* (*Aldamyia*) *apurinan* Shimabukuro, Figueira & Silva, sp. nov. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 280–287.
- Gadelha, E.P.N., Talhari, S., Guerra, J.A.O., Neves, L.O., Talhari, C., Gontijo, B., Silva Junior, R.M., Chrusciak Talhari, A., 2015. Efficacy and safety of a single dose pentamidine (7mg/kg) for patients with cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis*: a pilot study. *An. Bras. Dermatol.* 90, 807-13.
- Guerra, J.A., Maciel, M.G., Guerra, M.V., Talhari, A.C., Prestes, S.R., Fernandes, M.A., Da-Cruz, A.M., Martins, A., Coelho, L.I., Romero, G.A., Barbosa, Md., 2015. Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need? *Rev Soc. Bras. Med. Trop.* 48, 12-9.
- Hartley, M.A., Ronet, C., Zangger, H., Beverley, S.M., Fasel, N., 2012. *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 2-99.
- Ishikawa, E.A., Silveira, F.T., Magalhaes, A.L., Guerra Junior, R.B., Melo, M.N., Gomes, R., Silveira, T. G., Shaw, J.J., 2002. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 111-21.
- Jennings, Y.L., de Souza, A.A., Ishikawa, E.A., Shaw, J., Lainson, R., Silveira, F., 2014. Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* × *Leishmania* (*Viannia*) *shawi shawi*. *Parasite* 21, 39.
- Kuhls, K., Cupilillo, E., Silva, S.O., Schweynoch, C., Boité, M.C., Mello, M.N., Mauricio, I., Miles, M., Wirth, T., Schönian, G., 2013. Population structure and evidence for both clonality and recombination among Brazilian strains of the subgenus *Leishmania* (*Viannia*). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 31, e2490.
- Lanús, E.C., Piñero, J.E., González, A.C., Valladares, B., de Grosso, M.L., Salomón, O.D., 2005. Detection of *Leishmania braziliensis* in human paraffin-embedded tissues from Tucumán, Argentina by polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 187-92.
- Marlow, M.A., da Silva Mattos, M., Makowiecky, M.E., Eger, I., Rossetto, A.L., Grisard, E.C., Steindel, M. 2013. Divergent profile of emerging cutaneous leishmaniasis in subtropical Brazil: new endemic areas in the southern frontier. *PLoS One* 8, e56177.
- Marzochi, M.C., Marzochi, K, B., 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad. Saude Publica* 10, 359-75.
- Ministério da Saúde (MS), 2013. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, Brasil.
- Ogg, M.M., Carrion, R. Jr., Botelho, A.C., Mayrink, W., Correa-Oliveira, R., Patterson, J.L., 2003. Short report: quantification of leishmanial virus RNA in clinical samples and its possible role in pathogenesis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69, 309-13.
- Oliveira, F.S., Valette-Rosalino, C.M., Pacheco, S.J., Costa, F.A., Schubach, A.O., Pacheco, R.S., 2013. American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: assessment of parasite genetic variability at intra- and inter-patient levels. *Parasit. Vectors* 20, 6-189.

- Oliveira -Neto, M.P., Schubach, A., Araujo, M.L., Pirmez, C., 1996. High and low doses of antimony (Sbv) in American cutaneous leishmaniasis. A five years follow-up study of 15 patients. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 91, 207-9.
- Oliveira-Neto, M.P., Schubach, A., Mattos, M., Gonçalves-Costa, S.C., Pirmez, C. 1997. Treatment of American cutaneous leishmaniasis: a comparison between low dosage (5 mg/kg/day) and high dosage (20 mg/kg/day) antimony regimens. Pathol. Biol (Paris). 45, 496-9.
- Oliveira-Neto, M.P., Mattos, M.S., Perez, M.A., Da-Cruz, A.M., Fernandes, O., Moreira, J., Gonçalves-Costa, S.C., Brahin, L.R., Menezes, C.R., Pirmez, C., 2000. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. Int. J. Dermatol. 39, 506-14.
- Ourives-Neves, L., Chrusciak-Talhari, A., Gadelha, E.P.N., da Silva Júnior, R.M., Guerra, J.A.O., Ferreira, L.C.L., Talhari, S., 2011. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. An. Bras. Dermatol. 86, 1092-101.
- Pereira, LdeO., Maretti-Mira, A.C., Rodrigues, K.M., Lima, R.B., Oliveira-Neto, M.P., Cupolillo, E., Pirmez, C., de Oliveira, M.P., 2013. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with *Leishmania RNA virus 1* infection in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 108, 665-7.
- Pinheiro, M.P., Silva, J.H., Cavalcanti, K.B., de Azevedo, P.R., de Melo Ximenes, M.de F., 2013. Ecological interactions among phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in an agroforestry environment of northeast Brazil. J. Vector. Ecol. 38, 307-16.
- Pontello Junior, R., Gon Ados, S., Ogama, A., 2013. American cutaneous leishmaniasis: epidemiological profile of patients treated in Londrina from 1998 to 2009. An. Bras. Dermatol. 88, 748-53.
- Queiroz, A., Sousa, R., Heine, C., Cardoso, M., Guimarães, L.H., Machado, P.R., Carvalho, E.M., Riley, L.W., Wilson, M.E., Schriefer, A., 2012. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain polymorphisms. J. Clin. Microbiol. 50, 4028-34.
- Rodrigues, A.M., Hueb, M., Santos, T.A., Fontes, C.J., 2006. Factors associated with treatment failure of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate [in Portuguese]. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 39, 139–45.
- Rojas, R., Valderrama, L., Valderrama, M., Varona, M.X., Ouellette, M., Saravia, N.G., 2006. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. J. Infect. Dis. 193, 1375-83.
- Romero, G.A., Guerra, M.V., Paes, M.G., Macêdo, V.O., 2001. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. Am. J. Trop. Med. Hyg. 65, 456-65.
- Schriefer, A., Guimarães, L.H., Machado, P.R.L., Lessa, M., Lessa, H.A., Lago, E., Ritt, G., Góes-Neto, A., Schriefer, A.L., Riley, L.W., Carvalho, E.M., 2009. Geographic Clustering of Leishmaniasis in Northeastern Brazil. Emerg. Infect. Dis. 15, 871-876.

- Schubach, A.de O., Marzochi, K. B., Moreira, J.S., Schubach, T.M., Araújo, M.L., Vale, A.C., Passos, S.R., Marzochi, M.C. 2005. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 213-7.
- Stolk, W.A., Kulik, M.C., le Rutte, E.A., Jacobson, J., Richardus, J.H., de Vlas, S.J., Houweling, T.A., 2016. Between-Country Inequalities in the Neglected Tropical Disease Burden in 1990 and 2010, with Projections for 2020. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004560.
- Talhari, S., Sardinha, J.C., Schettini, A.P.M., Arias, J.R., Naiff, R.D., 1985. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. Resultados preliminares com a pentamidina. *An. Bras. Dermatol.* 60, 361-4.
- Talhari, S., Arias, J.R., Cunha, M.G.S., Naiff, R.D., Naiff, M.F., Freitas, R.A., Barrett, T., 1988. Leishmaniose no estado do Amazonas: aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. *An. Bras. Dermatol.* 63, 433-8.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- Teixeira, A.C., Paes, M.G., Guerra, J.deO., Prata, A., Silva-Vergara, M.L., 2008. Failure of both azithromycin and antimony to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 50, 157-60.
- Teles, C.B., Medeiros, J.F., dos Santos, A.P., de Freitas, L.A., Katsuragawa, T.H., Cantanhêde, L.M., Ferreira, R.de G., Camarg, L.M., 2015. Tri-Border area of Assis Brasil, Acre state, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 57, 343-7.
- Tojal, S.A., Cupolillo, E., Volpini, A.C., Almeida, R., Romero, A.R., 2006. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop. Med. Int. Health* 11, 1388-1398.
- Tuon, F.F., Amato, V.S., Graf, M.E., Siqueira, A.M., Nicodemo, A.C., Amato Neto, V., 2008. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis - a systematic review with a meta-analysis. *Int. J. Dermatol.* 47, 109-24.
- Vieira-Gonçalves, R., Pirmez, C., Jorge, M.E., Souza, W.J., Oliveira, M.P., Rutowitsch, M.S., Da-Cruz, A.M., 2008. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *Int. J. Dermatol.* 47, 926-32.

Tabela

Variáveis avaliadas no grupo de pacientes estudados (Rio de Janeiro e outros estados) atendidos no ambulatório do Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, RJ (2000-2011) segundo o desfecho terapêutico.

Variáveis	Desfecho Tratamento Grupo RJ (%)		Desfecho Tratamento Grupo OE (%)	
	Cura	Não Cura	Cura	Não Cura
Sexo				
Feminino	15 (30,6%)	7 (30,4%)	7 (24,1%)	3 (42,9%)
Masculino	34 (69,4%)	16 (69,6%)	22 (75,9%)	4 (57,1%)
Apresentação Clínica				
Leishmaniose Cutânea	41 (83,7%)	17 (73,9%)	17 (58,6%)	4 (57,1%)
Leishmaniose Cutâneomucosa	0 (0%)	2 (8,7%)	11 (37,9%)	1 (14,3%)
Leishmaniose Mucosa	8 (16,3%)	4 (17,4%)	1 (3,4%)	2 (28,6%)
Número de lesões cutâneas				
1 lesão	28 (57,1%)	11 (52,4%)	16 (59,3%)	4 (57,1%)
2 lesões	11 (22,4%)	5 (23,8%)	7 (25,9%)	1 (14,3%)
3 lesões	5 (10,2%)	2 (9,5%)	2 (7,4%)	1 (14,3%)
> 3 lesões	5 (10,2%)	3 (14,3%)	2 (7,4%)	1 (14,3%)
Duração das lesões cutâneas				
≤ 3 meses	39 (79,6%)	17 (73,9%)	10 (34,5%)	4 (57,1%)
>3 meses	10 (20,4%)	6 (26,1%)	19 (65,5%)	3 (42,9%)
Localização das lesões cutâneas				
Membros inferiores	12 (24,5%)	8 (38,1%)	17 (65,4%)	2 (28,6%)
Membros superiores	13 (26,5%)	2 (23,8%)	2 (7,7%)	1 (14,3%)
Membros inferiores e superiores	3 (6,1%)	1 (4,8%)	0 (0%)	2 (28,6%)
Outras	21 (42,9%)	7 (33,3%)	7 (26,9%)	2 (28,6%)
Localização das lesões mucosas				
Nariz*	2(25%)	1 (16,7%)	8 (61,5%)	2 (66,7%)
Boca	1 (12,5%)	1 (16,7%)	1 (7,7%)	0 (0%)
Nariz e boca**	2 (25%)	0 (0%)	2 (15,4%)	0 (0%)
Outras	3 (37,5%)	4 (66,7%)	2 (15,4%)	1 (33,3%)

Nenhuma das variáveis acima tiveram significância estatística no desfecho terapêutico, dentro dos grupos (RJ e OE)

* 1 paciente com lesões no nariz e faringe e 1 com lesões no nariz e laringe

** 2 pacientes com lesões no nariz, boca e laringe; 1 paciente com lesões no nariz, boca e faringe; 1 paciente com lesões no nariz, boca, faringe e laringe

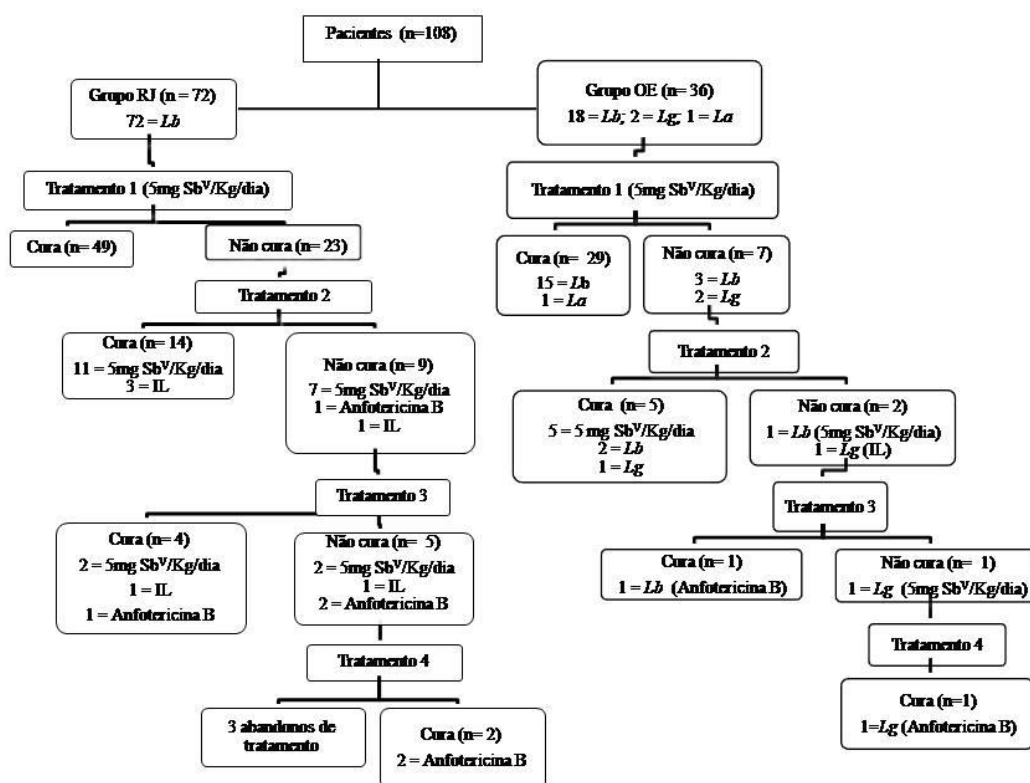


Figura – Esquema ilustrando as espécies de *Leishmania* identificadas, tratamentos utilizados e desfecho terapêutico dos pacientes atendidos no ambulatório do Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, RJ (2000-2011).

- Lb – *Leishmania braziliensis*
- Lg – *Leishmania guyanensis*
- La – *Leishmania amazonensis*
- IL – Tratamento Intralesional

b. Artigo 2:

Intestinal helminth coinfection is associated with mucosal lesions and poor response to therapy in American tegumentary leishmaniasis

Artigo publicado no periódico Acta Tropica, 2016; 154:42-9

Parasitas intestinais possuem elevada prevalência em diversas regiões do Brasil e, pouco se sabe sobre a influência da coinfeção por esses parasitos no perfil clínico e resposta terapêutica na LTA. Geralmente, não se dá grande importância a uma infecção intestinal parasitária, principalmente quando o paciente desenvolve uma doença mais grave. Sabendo-se que a resposta imune na LTA é predominantemente do tipo 1 e que esta é responsável pela resolução da doença, levantamos a hipótese de que uma possível resposta do tipo 2, produzida na infecção por helmintos intestinais, poderia influenciar o curso clínico e terapêutico da LTA. O estudo foi composto por um total de 109 pacientes tratados com o esquema de baixa dose (5mgSb^V/Kg/dia) de antimoniato de meglumina, dos quais 30 (27,5%) estavam coinfectados com parasitos intestinais. O desenvolvimento de lesões mucosas foi significativamente maior para o grupo de pacientes coinfectados com helmintos intestinais, mas não para os coinfectados por protozoários. Dentre os helmintos intestinais encontrados, os nematódeos, principalmente *A. lumbricoides*, tiveram maior significância estatística neste contexto. Os pacientes coinfectados por helmintos intestinais precisaram de um tempo maior para obter a cura das lesões e apresentaram uma frequência três vezes maior de má resposta quando comparados aos pacientes sem esta coinfeção. Isto pode ser devido à maior ocorrência da LM neste grupo. Na resposta imune da LM, elevados níveis de TNF- α e IFN- γ são observados. A coinfeção por helmintos possivelmente inibe a resposta tipo 1, devido à produção elevada de IL-4, IL-5, IL-10 e outros fatores, responsáveis por uma resposta tipo 2. *Ascaris lumbricoides* tem sido associado a uma forte polarização da resposta tipo 2. Nossos resultados confirmam uma influência deletéria da infecção por parasitos intestinais, sobretudo os helmintos, na LTA.

Esse artigo responde ao objetivo nº 3 desta tese



Intestinal helminth coinfection is associated with mucosal lesions and poor response to therapy in American tegumentary leishmaniasis



Rilza Beatriz G. Azeredo-Coutinho^a, Maria Inês Pimentel^b, Graziela Maria Zanini^c,
 Maria F. Madeira^b, Jamyra Iglesias Cataldo^b, Armando O. Schubach^b,
 Leonardo Pereira Quintella^d, Cintia Xavier de Mello^b, Sergio C.F. Mendonça^{e,*}

^a Secretaria Municipal de Saúde, Rua Afonso Cavalcanti, 455-Cidade Nova, 20211-110 Rio de Janeiro, Brazil

^b Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365-Manguinhos, 21040-900 Rio de Janeiro, Brazil

^c Serviço de Parasitologia, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365-Manguinhos, 21040-900 Rio de Janeiro, Brazil

^d Serviço de Anatomia Patológica, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365-Manguinhos, 21040-900 Rio de Janeiro, Brazil

^e Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365-Manguinhos, 21040-360 Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2014

Received in revised form 16 October 2015

Accepted 22 October 2015

Available online 27 October 2015

Keywords:

Mucocutaneous leishmaniasis

Coinfection

Leishmania (Viannia) braziliensis

Helminths

Nematodes

Ascaris lumbricoides

ABSTRACT

The most severe clinical form of American tegumentary leishmaniasis (ATL) due to *Leishmania braziliensis* is mucosal leishmaniasis (ML), characterized by destructive lesions in the facial mucosa. We performed a retrospective cohort study of 109 ATL patients from Rio de Janeiro State, Brazil, where ATL is caused by *L. braziliensis*, to evaluate the influence of intestinal parasite coinfections in the clinical course of ATL. Parasitological stool examination (PSE) was performed with samples from all patients by the sedimentation, Kato-Katz and Baermann-Moraes methods. The diagnosis of ATL was made from lesion biopsies by direct observation of amastigotes in Giemsa-stained imprints, isolation of *Leishmania* promastigotes or histopathological examination. All patients were treated with meglumine antimoniate. Patients with positive PSE had a frequency of mucosal lesions significantly higher than those with negative PSE ($p < 0.005$). The same was observed for infections with helminths in general ($p < 0.05$), with nematodes ($p < 0.05$) and with *Ascaris lumbricoides* ($p < 0.05$), but not for protozoan infections. Patients with intestinal parasites had poor response to therapy (therapeutic failure or relapse) significantly more frequently than the patients with negative stool examination ($p < 0.005$). A similar difference ($p < 0.005$) was observed between patients with positive and negative results for intestinal helminths, but not for intestinal protozoa. Patients with positive PSE took significantly longer to heal than those with negative PSE ($p < 0.005$). A similar difference was observed for intestinal helminth infections ($p < 0.005$), but not for protozoan infections. Our results indicate a deleterious influence of intestinal helminth infections in the clinical course of ATL and evidence for the first time an association between ML and these coinfections, particularly with nematodes and *A. lumbricoides*.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The HIV pandemic has taught us that concomitant infection with a different pathogen may alter dramatically the clinical expression of leishmaniasis, both visceral (Peters et al., 1990) and cutaneous (Coura et al., 1987). Differences in clinical and immunological features have been reported between patients with malaria-associated visceral leishmaniasis and those without this coinfection (van den

Bogaart et al., 2013, 2014). Clinical and immunological characteristics of cutaneous and mucosal leishmaniasis patients coinfecting with pathogenic mycobacteria have also been described (Delobel et al., 2003; Matos et al., 2005). However, little is still known about the effect that intestinal parasite coinfections may have on leishmaniasis.

Leishmania (Viannia) braziliensis is the main causative species of American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Brazil (Leite et al., 2012) and is virtually the only causative agent of ATL in the state of Rio de Janeiro (Vieira-Gonçalves et al., 2008), where this study was conducted. In fact, there is only one report of another dermatotropic *Leishmania* species (*Leishmania amazonensis*) causing human dis-

* Corresponding author.

E-mail address: mendonca@ioc.fiocruz.br (S.C.F. Mendonça).

ease in Rio de Janeiro state, in Paraty, very close to the border of the state of São Paulo (Azeredo-Coutinho et al., 2007). The human infection with *Leishmania braziliensis* may result in cutaneous and mucosal lesions (Gomes-Silva et al., 2007). The majority of *L. braziliensis*-infected patients present cutaneous leishmaniasis (CL), with lesions restricted to the skin. Lesions in nasal and/or oral mucosa may develop in a small proportion of patients (Jirmanus et al., 2012), characterizing the severe clinical form termed mucosal leishmaniasis (ML). ML, also known as mucocutaneous leishmaniasis, because one or more cutaneous lesions usually precede or may be still present during the development of this clinical form, is defined by destructive lesions of nasal, oral and pharyngeal mucosa, which, in the absence of adequate treatment, may progress to a mutilating and disabling disease (Goto and Lindoso, 2010). In Brazil, leishmaniasis is a compulsory notification disease. According to the Information System (Sinan) of the Brazilian Ministry of Health, ML accounted for 15.6% of ATL cases notified in Rio de Janeiro state during the period of 1999–2013. A proportion of 12.7% of mucosal leishmaniasis was reported among a series of patients studied at INI-Fiocruz (de Oliveira-Neto et al., 2000).

L. braziliensis infection in humans is characterized by a pro-inflammatory cytokine response, with high production of T helper (Th) 1 cytokines (Silveira et al., 2009; Souza et al., 2012). Although an exacerbated Th1 response may lead to tissue damage and be associated with the immunopathogenesis of ML (Bacellar et al., 2002), Th1 cytokines, such as interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α , are indispensable for the control of *Leishmania* infection in macrophages (Green et al., 1990), the major host cells for this parasite in their mammalian hosts (Naderer and McConville, 2011). On the other hand, infections with intestinal helminths are associated with type 2 responses (Pulendran and Artis, 2012), which are able to inhibit Th1 responses and IFN- γ production (Del Prete, 1998).

This retrospective study aimed at evaluating the influence of intestinal parasites in the clinical course of ATL and its putative association with ML.

2. Materials and methods

2.1. Patients

We performed a retrospective study based on records of the Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). The Laboratory of Leishmaniasis Surveillance of INI-Fiocruz is a referral center for the investigation of patients with suspected leishmaniasis and treatment of diagnosed cases, located in the city of Rio de Janeiro, Brazil. More than 90% of ATL cases in the municipality of Rio de Janeiro and at least 50% of the cases in the state of Rio de Janeiro are diagnosed and treated at INI-Fiocruz.

All American tegumentary patients from Rio de Janeiro State, treated in INI-Fiocruz with the antimonial schedule described below during the period of November 11, 2004, to November 22, 2006, were studied. The main demographic and clinical data of those patients are shown in Table 1.

The transmission of cutaneous leishmaniasis in Rio de Janeiro State is domestic and peridomestic (Souza et al., 1992). Occupations are not a risk factor in this context. The most frequent occupations of the patients were: student (23.9%), housewife (13.8%), brick mason (8.3%) and farmer (6.4%). Each of the other occupations accounted for less than 3.7% of the cases.

2.2. Diagnosis of American tegumentary leishmaniasis

The epidemiological history of the patients was investigated, and clinical, dermatological and otorhinolaryngological examina-

tions were performed as previously described (Oliveira-Neto et al., 2000; Schubach et al., 2005). All cases were parasitologically diagnosed. The diagnosis of ATL was made by isolation of promastigote forms of *Leishmania* from lesion biopsies, or by observation of amastigote forms in histopathological sections, in tissue samples obtained through biopsy of the lesions, performed in all patients. The biopsy specimen was divided into several fragments. One of them was used to make Giemsa-stained imprints and was then fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin and stained with haematoxylin-eosin, PAS, Grocott and Ziehl-Neelsen for histopathological examination. Another fragment was cultured in enriched blood agar medium (NNN) for the isolation of promastigote forms of *Leishmania* (Fagundes et al., 2010). *Leishmania* parasites were isolated from 88 patients (80.7%), amastigotes were seen by direct examination of Giemsa-stained material from lesion biopsies from 39 patients (35.8%) and by histopathological examination in 43 cases (39.4% of the patients). Forty-seven of the isolates were submitted to species characterization by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), performed according to previously described procedures (Cupolillo et al., 1994). Five enzyme systems were used: glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC.1.1.1.49), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH, EC.1.1.1.43), glucose phosphate isomerase (GPI, EC.5.3.1.9), nucleoside hydrolase (NH, 2 loci, EC. 3.2.2.1) and malic enzyme (ME, EC.1.1.1.40). All the samples analyzed by MLEE in this study were identified as *L. braziliensis* as they showed electromorphic profiles similar to the *L. braziliensis* reference strain MHOM/BR/75/M2903 (Ferreira et al., 2015). No isoenzymatic variants were observed. Among these isolates, 42 were from CL cases and five from ML cases.

2.3. Parasitological stool examination and treatment of intestinal parasites

Parasitological stool examination was routinely performed in all ATL patients attended at the leishmaniasis outpatient unit of INI/Fiocruz during the study period using the sedimentation, Kato-Katz and Baermann-Moraes methods. The presence of eggs in stool samples was determined with a thick smear technique using the Kato-Katz method (Katz et al., 1972; Peters et al., 1980). For detection of *Strongyloides stercoralis*, 25 g of fresh stool were examined using the Baermann-Moraes technique (Carvalho et al., 2012). The presence of protozoa was verified by a modified Hoffmann (Hoffmann et al., 1934) consisting in the centrifugation of 5 g of stool diluted in water and examination of the sediment by light microscopy.

The patients were treated for the pathogenic intestinal parasites found before the onset of specific therapy for leishmaniasis. The therapeutic schemes used were those recommended by the Brazilian Ministry of Health: for Ancylostomidae, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, albendazole 400 mg, single dose; for *S. stercoralis*, albendazole 400 mg/day for 3 consecutive days; for *Schistosoma mansoni*, praziquantel 50 mg/kg, single dose; for *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*, secnidazol 2 g, single dose. All treatments were given by oral route. The infections with *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli* and *Endolimax nana* were asymptomatic and were not treated.

2.4. Leishmaniasis treatment and follow-up

All patients were treated with meglumine antimoniate, 5 mg Sb/kg/day for 30 days (Oliveira-Neto et al., 1997), administered intramuscularly, at the leishmaniasis outpatient unit of INI-Fiocruz, and all of them completed the 30 day schedule. Concerning the outcome of antimonial therapy, cure was defined as complete epithelialization of the lesions without any sign of inflammation including nodules, papules, erythema, edema, itching or scale. In

Table 1
Main clinical and demographic characteristics of the study patients.

Clinical and demographic characteristics	Cutaneous leishmaniasis	Mucosal leishmaniasis ^a	Total of patients
Number of patients	99	10	109
Age (years)	35.9 ± 15.0 ^b	37.0 ± 21.6 ^a	36.1 ± 15.7 ^a
Sex composition (M/F)	61/38	9/1	70/39
LST ^c (mm)	19.0 ± 12.6 ^c	15.5 ± 11.3 ^a	18.74 ± 12.0 ^a
Time of evolution (months)	3.8 ± 9.8 ^a	6.5 ± 8.0 ^a	4.0 ± 10.0 ^a

^a Among them, 3 had only mucosal lesions and 7 had concomitant cutaneous lesions.

^b Mean ± SD.

^c LST—Leishmanin skin test.

ML cases clinical cure was assessed by fiber optic ENT (ears, nose and throat) endoscopy as previously described (Oliveira-Neto et al., 2000; Schubach et al., 2005). If cure was not achieved within three months after the end of the therapy, this was considered as therapeutic failure (de Azeredo-Coutinho and Mendonça, 2002). Relapse was defined as the reappearance of the inflammation signs described above or ulceration in the lesions after the achievement of clinical cure, as defined above. In case of therapeutic failure or relapse, the described antimonial schedule was repeated. In case of therapeutic failure after completion of a second antimonial treatment, the drug used was amphotericin B. Cure was eventually obtained for all patients. This study was approved by the Ethics Review Committee of INI-Fiocruz, Brazilian Ministry of Health.

2.5. Statistical analysis

In the statistical analysis of the data, the following tests were used. The Fisher test was used for the analysis of 2 × 2 contingency tables. The Mann–Whitney test was used to compare continuous variables. The log-rank (Mantel–Cox) test was employed to compare the healing time between the study groups. Odds ratio (OR) and its respective confidence interval (CI) was used as a measure of the association among the variables. A *p*-value less than 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Study patients and intestinal parasite coinfections

Table 2 shows the intestinal parasite coinfections found in the 109 studied ATL patients. Thirty patients (27.5%) were diagnosed with intestinal parasite coinfections. Fifteen (13.8%) of them harbored helminth infections, 14 (12.8%) had intestinal protozoan infections and one patient was coinfecting with intestinal protozoa and helminth.

With regard to demographic data, there was no significant difference among the age composition of the ATL patients coinfecting with intestinal parasites in general, those coinfecting with intestinal helminths, those coinfecting with intestinal protozoa and those without intestinal parasite coinfection. The mean ages (SD) of these groups were respectively 38.5 (16.7), 42 (16.7), 36.5 (17.4) and 35.1 (15.3) years. The gender distribution was not significantly different between the patients coinfecting with intestinal parasites in general and those who had not intestinal parasites (respectively 16 male/14 female and 50 male/29 female). There was a significant difference (*p* < 0.05) between patients coinfecting with intestinal helminths and those coinfecting with intestinal protozoa with regard to gender composition, respectively 14 male/2 female and 7 male/8 female, but not between any of these groups and the patients who had not intestinal coinfections.

The patients coinfecting with intestinal parasites in general, those coinfecting with intestinal helminths, those coinfecting with intestinal protozoa and those without evidence of intestinal parasite coinfection had the following clinical features, respectively:

Table 2
Intestinal parasite coinfections found in the study patients.

Intestinal parasite(s)	Number of patients
Helminths (total of infections)	15
Ancylostomidae ^a	3
<i>Ascaris lumbricoides</i>	3
<i>Strongyloides stercoralis</i>	2
<i>Trichuris trichiura</i>	2
<i>Enterobius vermicularis</i>	1
<i>Schistosoma mansoni</i>	1
<i>S. mansoni</i> , <i>S. stercoralis</i>	1
Ancylostomidae ^a , <i>S. stercoralis</i>	2
Protozoa (total of infections)	14
– <i>Blastocystis hominis</i>	1
– <i>Entamoeba coli</i>	1
– <i>Entamoeba histolytica</i>	2
– <i>Giardia lamblia</i>	3
– <i>Endolimax nana</i>	4
– <i>E. nana</i> , <i>E. histolytica</i>	1
– <i>E. histolytica</i> , <i>E. coli</i>	1
– <i>G. lamblia</i> , <i>E. histolytica</i>	1
Helminth and protozoa (<i>E. coli</i> , <i>E. histolytica</i> , <i>S. mansoni</i>)	1
Patients with intestinal parasite infections	30
Patients with negative parasitological stool examination	79
Total of patients	109

^a *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale* are both present in Rio de Janeiro State but the former species is the most prevalent.

number of lesions (7.6 ± 22.1, 11.6 ± 29.8, 3.0 ± 4.6 and 3.3 ± 11.3), duration of the lesions in months (7.6 ± 17.6, 5.4 ± 7.4, 9.7 ± 24.0 and 2.6 ± 1.8) and size of the largest cutaneous lesion in mm (38.1 ± 21.7, 35.4 ± 21.8, 43.8 ± 23.6 and 32.9 ± 14.3). We could not find differences between these patient groups concerning the above-mentioned clinical features, except between the patients coinfecting with intestinal parasites in general and the patients with negative parasitological stool examination with regard to the duration of disease at the time of diagnosis, respectively 7.6 ± 17.6 and 2.6 ± 1.8 months (*p* < 0.05).

3.2. Intestinal parasite coinfections and mucosal leishmaniasis

ML was significantly more frequent (*p* < 0.005, OR 0.13, 95% CI 0.03101 to 0.5425) among the patients with intestinal parasites than among those who were free of these coinfections (Fig. 1a). Patients with helminth coinfections had also a frequency of ML significantly higher (*p* < 0.05, OR 0.21, 95% CI 0.05091 to 0.8408) than those without helminths (Fig. 1b). The same difference was observed for nematode (*p* < 0.05, OR 0.04, 95% CI 0.003327 to 0.5007) (Fig. 1c) and *A. lumbricoides* (*p* < 0.05, OR 0.15, 95% CI 0.03557 to 0.6326) (Fig. 1d) infections, but not for protozoan infections (data not shown).

3.3. Intestinal parasite coinfections and response to antimonial therapy

Among the 109 patients studied, fifteen had poor response to therapy: three with therapeutic failure and 12 having relapsed,

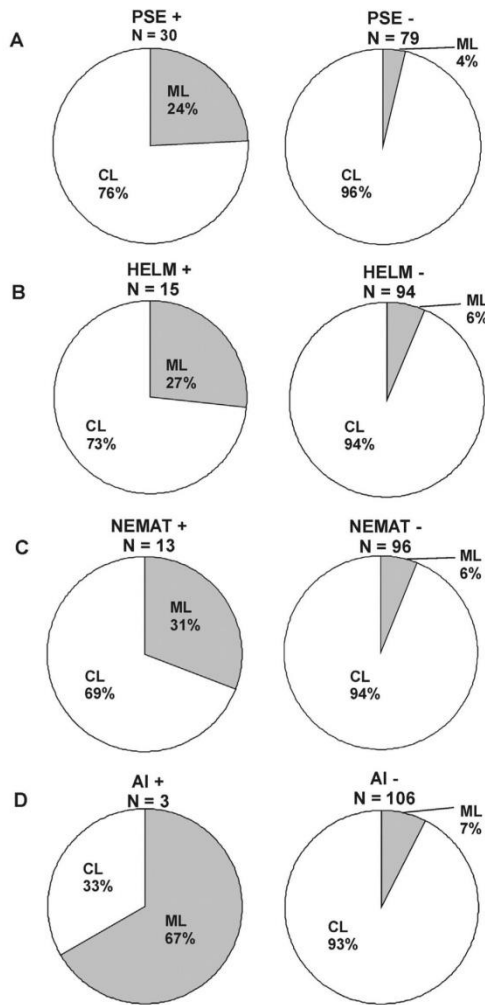


Fig. 1. Distribution of clinical forms, mucosal leishmaniasis (ML) and cutaneous leishmaniasis (CL), in American tegumentary leishmaniasis patients with positive (+) or negative (-) parasitological stool examinations (PSE) for (A) intestinal parasites in general (PSE), (B) helminths (HELM), (C) nematodes (NEMAT), and (D) *A. lumbricoides* (AI). ML was significantly more frequent in the PSE +, HELM +, NEMAT + and AI + groups than in PSE - ($p < 0.005$), HELM -, NEMAT - and AI - ($p < 0.05$) groups, respectively (Fisher test).

according to the definitions described above. Poor response to therapy was significantly more frequent ($p < 0.005$, OR 0.23, 95% CI 0.07377 to 0.6912) in the group of patients with intestinal parasites than in the group with negative stool examination (Fig. 2a). A similar difference ($p < 0.005$, OR 0.20, 95% CI 0.06768 to 0.6102) was observed between patients infected and non-infected with intestinal helminths (Fig. 2b), but not between patients infected or not with protozoa (data not shown).

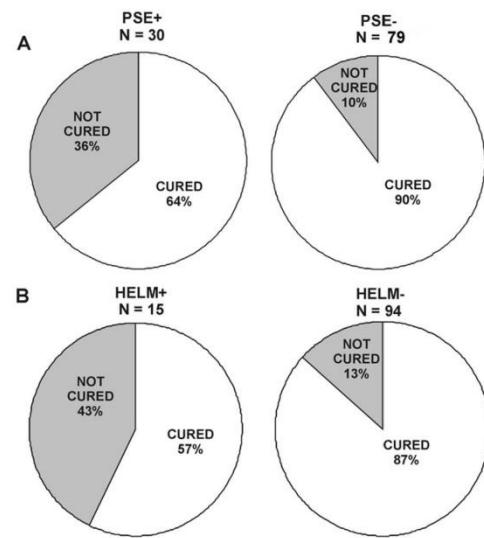


Fig. 2. Influence of intestinal parasite coinfections in the clinical outcome (response to antimonial therapy) of American tegumentary leishmaniasis patients. (A) outcome (CURED or NOT CURED, meaning therapeutic failure or relapse) in the groups with positive (+) or negative (-) parasitological stool examinations (PSE). (B) outcome in the groups with positive (+) or negative (-) helminth (HELM) stool examinations. Poor response to therapy (therapeutic failure or relapse) was significantly more frequent in the PSE + and HELM + groups than in PSE- and HELM- groups, respectively ($p < 0.005$, Fisher test).

3.4. Intestinal parasite coinfections and time to heal

Patients with intestinal parasites took significantly longer ($p < 0.005$) to heal their lesions than those free from these coinfections (Fig. 3a). A significant difference ($p < 0.005$) was found between the patients with helminth infections and those without helminths (Fig. 3b). There was no difference in this regard between patients infected or not with protozoa (data not shown).

4. Discussion

Helminths are multicellular parasites that cause chronic infection with a slow rate of increase in parasite loads (Wilson and Maizels, 2004). The mammalian host immune response to helminth infection has been consistently characterized as a Th2 response, typically involving the cytokines interleukin (IL)-4, IL-5, IL-10 and IL-13, immunoglobulin E (IgE) and specific effector cells, such as mast cells and eosinophils (Maizels and Yazdanbakhsh, 2003). This Th2 response is generally suited for the control of such infections. However, during coevolution with their hosts, these parasites have developed regulatory pathways to prevent protective Th2 responses (Taylor et al., 2012). Cytokines such as tumor necrosis factor (TGF)- β and IL-10, and CD4+Foxp3+ T regulatory cells (Treg) participate in Th2 suppression (Taylor et al., 2012). Helminth infections are associated with downmodulated responsiveness to bystander antigens (Greene et al., 1983), vaccines (Sabin et al., 1996; Cooper et al., 1998), allogeneic transplants (Liwski et al., 2000), and even mitogens (Soulsby, 1987). With respect to concurrent infections, helminth parasitism has been shown to be either protective (Fox et al., 2000; Nacher et al., 2001) or deleterious (Rocha et al., 1971; Elrefaei et al., 2003).

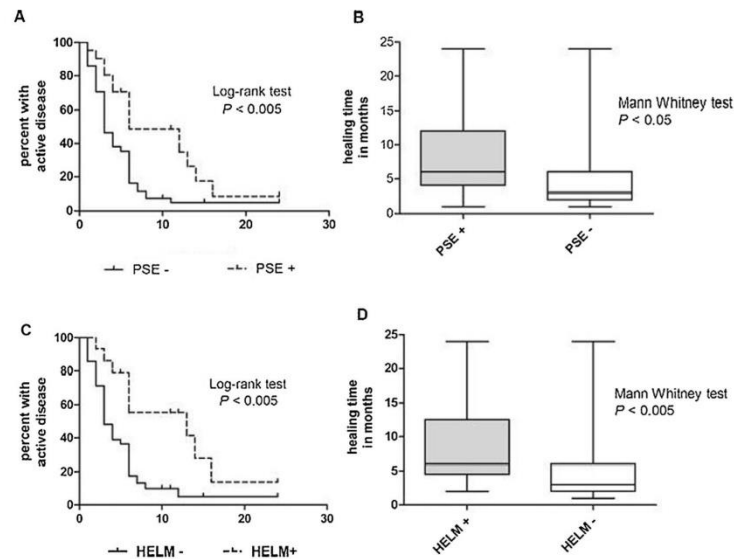


Fig. 3. (A, B) Comparison between American tegumentary leishmaniasis patients (ATL) with positive and negative parasitological stool examination (PSE + and PSE -, respectively) and (C, D) between patients with positive and negative results of stool examination for helminth co-infection (HELM + and HELM -, respectively). (A, C) Percentages of patients with active disease during time after treatment and (B and D) median healing times and quartiles.

There is a consensus that the control of *Leishmania* infection requires a Th1 response and macrophage activation (Soong et al., 2012). On the other hand, susceptibility to this parasite has been associated with Th2 (Locksley et al., 1987) and Treg (Sacks and Anderson, 2004) responses, both of them induced by helminth infections. In this sense, it could be expected that helminth co-infection influences negatively the clinical course and outcome of human leishmaniasis. In fact, in a prospective cohort study carried out in an area where CL is predominantly caused by *L. braziliensis*, in Bahia State, Brazil, it was shown that CL patients coinfected with helminths took longer to heal than CL patients without helminth co-infection. In that study, the authors also assessed the cytokine response (IFN- γ and IL-5) in supernatants of *L. braziliensis* antigen-stimulated cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from CL patients coinfected with helminths and without evidence of helminth co-infection, but they did not find differences between the two groups in this regard. Total IgE levels were apparently higher in the coinfected group but the difference between the groups was not statistically significant (O'Neal et al., 2007). Our results indicate a deleterious influence of helminth co-infection in the course of CL in another area of *L. braziliensis* transmission (Rio de Janeiro State). Although the infecting *Leishmania* species was determined in less than 50% of our patients, all isolates were characterized as *L. braziliensis*. Thus, considering that all patients were from Rio de Janeiro, an area of *L. braziliensis* transmission (Vieira-Gonçalves et al., 2008; Azeredo-Coutinho et al., 2007), it is reasonable to assume that *L. braziliensis* was the causative agent in all cases. Besides this similarity between the two areas, there are important differences between them. The cited study (O'Neal et al., 2007) was conducted in an agricultural rural area and, as expected, the prevalence of helminth infection was extremely high in those patients (almost 90%). In Rio de Janeiro State, however, American tegumentary leishmaniasis transmission generally occurs within metropolitan areas (Oliveira-Neto et al., 1988; Rangel et al., 1990; de Oliveira-Neto et al., 2000). This fact can account for the lower

prevalence of helminth infection found in our patients (13.8%). Our findings are in agreement with the enteroparasitosis prevalence previously found in patients assisted in the hospital where the present study was conducted (Neto et al., 2009).

Besides taking a longer time to heal than the helminth-free patients, the CL patients coinfected with helminths had a more than three times higher frequency of poor response to therapy (therapeutic failure or relapse) than the patients without helminth co-infection ($p < 0.005$). The higher proportion of ML in the group with intestinal helminth co-infection may have contributed to the poorer response to therapy observed in this group as compared to the patients without evidence of helminth co-infection. As expected, the frequency of therapeutic failure was significantly higher ($p < 0.0005$, OR 0.07, 95% CI: 0.01362 to 0.3503) and time to heal was significantly longer ($p < 0.001$) in ML patients than in CL patients.

The fact that no difference was found in the clinical course or outcome of CL between the groups infected and non-infected with protozoa indicate that the well known immunomodulatory effects of helminth co-infection on the immune response to other antigens (Greene et al., 1983; Sabin et al., 1996; Cooper et al., 1998; Liwski et al., 2000) are responsible for the delay of cure and the worse response to therapy found in the helminth-coinfected patients.

The present study reveals, for the first time, an association between ML and intestinal helminth co-infection. This observation is intriguing from the immunological point of view. ML patients have upregulated anti-*Leishmania* Th1 responses. PBMC from ML patients produce significantly more IFN- γ than cells from CL patients when stimulated with *Leishmania* antigens and this IFN- γ production is less susceptible to IL-10-mediated suppression than that found in PBMC cultures from CL patients (Bacellar et al., 2002). The uncontrolled exacerbated inflammatory type 1 immune response seen in ML patients is possibly related to a decreased expression of IL-10 receptor (Faria et al., 2005). Further investigations are needed to understand the association between ML, a

clinical form characterized by an exacerbated type 1 response and intestinal helminth infections that are potent inducers of Th2 and Treg responses, both of them capable of inhibiting Th1 responses. Our results do not allow the inference of a causal relationship in either way. ML is a chronic condition that may render these patients more susceptible to helminths. In mice, susceptibility to infection with the intestinal nematode *Trichuris muris* has been correlated with upregulated Th1 responses promoted by treatment with IL-12 (Bancroft et al., 1997). It should also be considered that *in situ* studies have described a mixed Th1/Th2 inflammatory response in mucosal leishmaniasis lesions (Pirmez et al., 1993; Amato et al., 2003). Unfortunately, anti-*Leishmania* T cell-mediated immune responses were not assessed in the present study.

We were also able to find associations between development of ML and nematode infections and, specifically, between ML and the presence of *A. lumbricoides*. Nematode infections are a major global public health problem. The global disability-adjusted life-years (DALYs) lost to soil-transmitted nematodes (*A. lumbricoides*, *T. trichiura*, and the hookworms) was estimated as 39 millions, with one billion infections with each of these pathogens worldwide (Chan, 1997). These parasites are extremely successful in modulating their host's immune response in order to avoid their elimination and also to restrain pathology that could compromise the host survival (Else, 2005). Among nematodes, *A. lumbricoides* infections have been associated with a highly polarized type 2 cytokine response (Cooper et al., 2000).

The study groups (coinfected with intestinal parasites in general, coinfected with intestinal helminths, coinfected with intestinal protozoa and without intestinal parasite coinfection) had comparable demographic and clinical characteristics. The exceptions were: significant differences between patients coinfected with intestinal helminths and those coinfected with intestinal protozoa with regard to gender composition, and between patients coinfected with intestinal parasites in general and those with negative parasitological stool examination concerning duration of the lesions. In the former case, since there was no difference in gender composition between the group without evidence of intestinal parasites and the other two groups (coinfected with parasites in general and with helminths), the cited difference should not have impaired the analysis of the results. In the latter case, to our knowledge, there is no published evidence to suggest that lesions with longer duration would have a worse response to therapy. In fact, since American cutaneous leishmaniasis usually tends to self-healing (David and Craft, 2009) one could expect the opposite.

It is possible that the poorer response to therapy of the group coinfected with intestinal parasites is associated with the higher frequency of ML in this group as compared to that of the group without evidence of intestinal parasite coinfection, because ML is usually more resistant to antimonial therapy than CL, and therapeutic failure and recurrences are more frequent in the former than in the latter clinical form of ATL (Tuon et al., 2008). But, if the ML patients were excluded from the analysis, the group of CL patients with positive parasitological stool examination (PSE) still took significantly more time to heal ($p < 0.05$, Mantel-Cox test) than did the patients with negative results in PSE (data not shown), confirming previous results from others (O'Neal et al., 2007).

After the demonstration that CL in patients coinfected with helminths take longer to heal (O'Neal et al., 2007), a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial was conducted to examine the effect of early treatment of intestinal helminth infection on the clinical course of patients with CL treated with pentavalent antimony. The authors did not find statistically significant differences in overall time to cure between the group receiving early treatment of intestinal helminth infection and the group for which this treatment was deferred, showing that antihelminthic therapy consisting of an association of albendazole, ivermectin, and

praziquantel does not abbreviate the time for cure in CL patients co-infected with helminths (Newlove et al., 2011).

It is well known that the cytokine milieu in the early phase of leishmanial infection is critical for its outcome (Rogers and Titus, 2004; Mougneau et al., 2011). In mice, it has been shown that IL-12 and TNF are required for the control of *L. braziliensis* *in vivo* and *in vitro* (Rocha et al., 2007), but nematodes or their products are able to inhibit IL-12p40 (Massacand et al., 2009) and TNF- α (Harnett et al., 2004) production. Thus, it is possible that the deleterious effect of intestinal helminth coinfection on the clinical course of ATL is exerted in the early phase of leishmanial infection by directing the characteristics of the adaptive anti-*Leishmania* immune response that will arise. If this is the case, the antihelminthic treatment after the development of the lesions will no longer be useful. Treatment of mice infected with the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* before antimalarial immunization restored the protective immunity to malaria challenge, but had no effect after antimalarial immunization (Su et al., 2006). Also concerning malaria, in a study aimed at determining whether or not deworming programs can impact on *Plasmodium* infections in preschool children, repeated antihelminthic treatments resulted in a significantly lower increase in the prevalence of *Plasmodium* infection in children which was concomitant with a reduction in both the prevalence and intensity of *A. lumbricoides* infections (Kirwan et al., 2010). Since there is accumulating evidence that intestinal helminth coinfection is associated with severity of ATL, represented by longer time to heal, worse response to therapy and mucosal leishmaniasis, it is possible that the control of intestinal helminth infections may have a beneficial impact on the management of ATL in areas where these infections coexist. In other words, environmental infection control and preventive community interventions may succeed where individual therapy has failed.

Acknowledgements

This study received support of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, process 402557/2011-5), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, processes E-26/110.620/2012 and E-26/110.595/2014) and Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). The authors are grateful to Drs. Cláudia Maria Valette-Rosalino, Ana Cristina da Costa Martins and João Moreira for performing otorhinolaryngological examinations, and Drs. Érica de Camargo Ferreira e Vasconcellos and Mariza de Matos Salgueiro for the clinical and dermatological follow-up of the patients.

References

- Amato, V.S., de Andrade, H.F., Duarte, M.L., 2003. Mucosal leishmaniasis: *in situ* characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop.* 85, 39–49, [http://dx.doi.org/10.1016/s0001-706x\(02\)00260-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0001-706x(02)00260-7).
- Azeredo-Coutinho, R.B., Conceição-Silva, F., Schubach, A., Cupolillo, E., Quintella, L.P., Madeira, M.F., Pacheco, R.S., Valette-Rosalino, C.M., Mendonça, S.C., 2007. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101 (July (7)), 735–737.
- Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Ribeiro de Jesus, A., Dutra, W.O., Gollob, K.J., Carvalho, E.M., 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect. Immun.* 70, 6734–6740, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.12.6734-6740.2002>.
- Bancroft, A.J., Else, K.J., Sypek, J.P., Grecnis, R.K., 1997. Interleukin-12 promotes a chronic intestinal nematode infection. *Eur. J. Immunol.* 27, 866–870, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830270410>.
- Carvalho, G.L., Moreira, L.E., Pena, J.L., Marinho, C.C., Bahia, M.T., Machado-Coelho, G.L., 2012. A comparative study of the TF-Test[®], Kato-Katz, Hoffman-Pons-Janer, Willis and Baermann-Moraes coprologic methods for the detection of human parasitosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 80–84, <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000100011>.

- Chan, M.S., 1997. The global burden of intestinal nematode infections-fifty years on. *Parasitol. Today* 13, 438–443. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-4758\(97\)01144-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-4758(97)01144-7).
- Cooper, P.J., Chico, M.E., Sandoval, C., Espinel, I., Guevara, A., Kennedy, M.W., Urban Jr., J.F., Griffin, G.E., Nutman, T.B., 2000. Human infection with *Ascaris lumbricoides* associated with a polarized cytokine response. *J. Infect. Dis.* 182, 1207–1213. <http://dx.doi.org/10.1086/315830>.
- Cooper, P.J., Espinel, I., Paredes, W., Guderian, R.H., Nutman, T.B., 1998. Impaired tetanus-specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human onchocerciasis: a possible role for interleukin-10. *J. Infect. Dis.* 178, 1133–1138. <http://dx.doi.org/10.1086/515661>.
- Coura, J.R., Galvão-Castro, B., Grimaldi Júnior, G., 1987. Disseminated American cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82, 581–582. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02761987000400019>.
- Cupolillo, E., Grimaldi Jr., G., Momen, H., 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 296–311.
- David, C.V., Craft, N., 2009. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol. Ther.* 22, 491–502. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x>.
- de Azeredo-Coutinho, R.B., Mendonça, S.C., 2002. An intermittent schedule is better than continuous regimen of antimonial therapy for cutaneous leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35, 477–481.
- de Oliveira-Neto, M.P., Mattos, M.S., Perez, M.A., Da-Cruz, A.M., Fernandes, O., Moreira, J., Gonçalves-Costa, S.C., Brahin, L.R., Menezes, C.R., Pirmez, C., 2000. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int. J. Dermatol.* 39, 506–514. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-4362.2000.00969.x>.
- Del Prete, G., 1998. The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int. Rev. Immunol.* 16, 427–455.
- Delobel, P., Launois, P., Djossou, F., Sainte-Marie, D., Pradinaud, R., 2003. American cutaneous leishmaniasis, lepromatous leprosy, and pulmonary tuberculosis coinfection with downregulation of the T-helper 1 cell response. *Clin. Infect. Dis.* 37, 628–633. <http://dx.doi.org/10.1086/376632>.
- Ehrafai, M., El-Skeikh, N., Kamal, K., Cao, H., 2003. HCV-specific CD27⁺ CD28⁺ memory T cells are depleted in hepatitis C virus and *Schistosoma mansoni* co-infection. *Immunology* 110, 513–518. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2003.01769.x>.
- Eise, K.J., 2005. Have gastrointestinal nematodes outwitted the immune system? *Parasite Immunol.* 27, 407–415. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00788.x>.
- Fagundes, A., Schubach, A., Paula, C.C., Bogio, A., Antonio, LdeF., Schiavoni, P.B., Monteiro, V.de.S., Madeira, M.de.F., Quintella, L.P., Valet-Rosalino, C.M., Vasconcelos, E.de C., Azeredo-Coutinho, R.B., Pacheco, R.S., Marzochi, M.C., Marzochi, K.B., 2010. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral center. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 109–112. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000100018>.
- Faria, D.R., Gollob, K.J., Barbosa Jr., J., Schriefer, A., Machado, P.R., Lessa, H., Carvalho, L.P., Romano-Silva, M.A., de Jesus, A.R., Carvalho, E.M., Dutra, W.O., 2005. Decreased *in situ* expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect. Immun.* 73, 7853–7859. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.12.7853-7859.2005>.
- Ferreira, E.de C., Cruz, I., Cañavate, C., de Melo, L.A., Pereira, A.A., Madeira, F.A., Valério, S.A., Cunha, H.M., Paglia, A.P., Gontijo, C.M., 2015. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. *BMC Vet. Res.* 11, 71. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-015-0392-y>.
- Fox, J.G., Beck, P., Dangler, C.A., Whary, M.T., Wang, T.C., Shi, H.N., Nagler-Anderson, C., 2000. Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. *Nat. Med.* 6, 536–544. <http://dx.doi.org/10.1038/75015>.
- Gomes-Silva, A., de Cássia Bittar, R., Dos Santos Nogueira, R., Amato, V.S., da Silva Mattos, M., Oliveira-Neto, M.P., Coutinho, S.G., Da-Cruz, A.M., 2007. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin. Exp. Immunol.* 149, 440–444. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03436.x>.
- Goto, H., Lindoso, J.A., 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Exp. Rev. Anti Infect. Ther.* 8, 419–433. <http://dx.doi.org/10.1586/eri.10.19>.
- Green, S.J., Crawford, R.M., Hockmeyer, J.T., Meltzer, M.S., Nacy, C.A., 1990. *Leishmania* major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* 145, 4290–4297.
- Greene, B.M., Fanning, M.M., Ellner, J.J., 1983. Nonspecific suppression of antigen-induced lymphocyte blastogenesis in *Onchocerca volvulus* infection in man. *Clin. Exp. Immunol.* 52, 259–265.
- Harnett, W., Harnett, M.M., Leung, B.P., Gracie, J.A., McInnes, I.B., 2004. The anti-inflammatory potential of the filarial nematode secreted product, ES-62. *Curr. Top. Med. Chem.* 4, 553–559. <http://dx.doi.org/10.2174/1568026043451212>.
- Hoffmann, W.A., Pons, J.A., Janer, J.L., 1934. The sedimentation concentration method in *Schistosoma mansoni*. Puerto Rico J. Public Health Trop. Med. 9, 283–291.
- Jirmanus, L., Glesby, M.J., Guimaraes, L.H., Lago, E., Rosa, M.E., Machado, P.R., Carvalho, E.M., 2012. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86, 426–433. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0378>.
- Katz, N., Chaves, A., Pellegrino, J., 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 14, 397–400.
- Kirwan, P., Jackson, A.L., Asaolu, S.O., Molloy, S.F., Abiona, T.C., Bruce, M.C., Ranford-Cartwright, L., O'Neill, S.M., Holland, C.V., 2010. Impact of repeated four-monthly anthelmintic treatment on *Plasmodium* infection in preschool children: a double-blind placebo-controlled randomized trial. *BMC Infect. Dis.* 10, 277. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-10-277>.
- Leite, P.M., Gomes, R.S., Figueiredo, A.B., Serafim, T.D., Tafuri, W.L., de Souza, C.C., Moura, S.A., Fietto, J.L., Melo, M.N., Ribeiro-Dias, F., Oliveira, M.A., Rabello, A., Afonso, L.C., 2012. Ecto-nucleotidase activities of promastigotes from *Leishmania (Viannia) braziliensis* relates to parasite infectivity and disease clinical outcome. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1850. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001850>.
- Liwski, R., Zhou, J., McAlister, V., Lee, T.D., 2000. Prolongation of allograft survival by *Nippostrongylus brasiliensis* is associated with decreased allospecific cytotoxic T lymphocyte activity and development of T cytotoxic cell type 2 cells. *Transplantation* 69, 1912–1922. <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-200005150-00029>.
- Massacand, J.C., Stettler, R.C., Meier, R., Humphreys, N.E., Grecis, R.K., Marsland, B.J., Harris, N.L., 2009. Helminth products bypass the need for TSLP in Th2 immune responses by directly modulating dendritic cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13968–13973. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0906367106>.
- Maizels, R.M., Yazdanbakhsh, M., 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 733–744. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1183>.
- Matos, D.S., Azeredo-Coutinho, R.B., Schubach, A., Conceição-Silva, F., Baptista, C., Moreira, J.S., Mendonça, S.C., 2005. Differential interferon-gamma production characterizes the cytokine responses to *Leishmania* and *Mycobacterium leprae* antigens in concomitant mucocutaneous leishmaniasis and lepromatous leprosy. *Clin. Infect. Dis.* 40, e5–e12. <http://dx.doi.org/10.1086/427069>.
- Mougeon, E., Bihl, F., Glaichenhaus, N., 2011. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol. Rev.* 240, 286–296. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00983.x>.
- Nacher, M., Singhasivanon, P., Silachamroon, U., Treeprasertskul, S., Vannaphan, S., Traore, B., Gay, F., Looareesuwan, S., 2001. Helminth infections are associated with protection from malaria-related acute renal failure and jaundice in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 834–836.
- Naderer, T., McConville, M.J., 2011. Intracellular growth and pathogenesis of *Leishmania* parasites. *Essays Biochem.* 51, 81–95. <http://dx.doi.org/10.1042/bse0510081>.
- Neto, L.M., Oliveira Rde, V., Totino Sant'Anna, P.R.F.M., Coelho Vde, O., Rolla, V.C., Zanini, G.M., 2006. Enteroparasitosis prevalence and parasitism influence in clinical outcomes of tuberculosis patients with or without HIV co-infection in a reference hospital in Rio de Janeiro (2000–2006). *Braz. J. Infect. Dis.* 13, 427–432. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702009000600008>.
- Newlove, T., Guimaraes, L.H., Morgan, D.J., Alcântara, L., Glesby, M.J., Carvalho, E.M., Machado, P.R., 2011. Antihelminthic therapy and antimony in cutaneous leishmaniasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients co-infected with helminths and *Leishmania braziliensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84, 551–555. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0423>.
- Oliveira-Neto, M.P., Mattos, M., Pirmez, C., Fernandes, O., Gonçalves-Costa, S.C., Souza, C.F., Grimaldi Jr., G., 2000. Mucosal leishmaniasis (espundia) responsive to low dose of N-methyl glucamine (Glucantime) in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 42, 321–325. <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-4665200000600004>.
- Oliveira-Neto, M.P., Pirmez, C., Rangel, E., Schubach, A., Grimaldi Júnior, G., 1988. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83, 427–435. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02761988000400006>.
- Oliveira-Neto, M.P., Schubach, A., Mattos, M., Gonçalves-Costa, S.C., Pirmez, C., 1997. 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.* 57, 651–655.
- O'Neal, S.E., Guimaraes, L.H., Machado, P.R., Alcântara, L., Morgan, D.J., Passos, S., Glesby, M.J., Carvalho, E.M., 2007. Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 195, 142–148. <http://dx.doi.org/10.1086/509808>.
- Peters, B.S., Fish, D., Golden, R., Evans, D.A., Bryceson, A.D., Pinching, A.J., 1990. Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical features and response to therapy. *Q. J. Med.* 77, 1101–1111. <http://dx.doi.org/10.1093/qjmed/77.2.1101>.
- Peters, P., El Alamy, M., Warren, K., Mahmoud, A., 1980. Quick Kato smear for field quantification of *Schistosoma mansoni* eggs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 217–219.
- Pirmez, C., Yamamura, M., Uyemura, K., Paes-Oliveira, M., Conceição-Silva, F., Modlin, R.L., 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* 91, 1390–1395. <http://dx.doi.org/10.1172/jci116341>.

- Pulendran, B., Artis, D., 2012. New paradigms in type 2 immunity. *Science* 337, 431–435. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1221064>.
- Rangel, E.F., Azevedo, A.C., Andrade, C.A., Souza, N.A., Wermelinger, E.D., 1990. Studies on sandfly fauna (*Diptera*: Psychodidae) in a foci of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85, 39–45. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02761990000100006>.
- Rocha, F.J., Schleicher, U., Mattner, J., Alber, G., Bogdan, C., 2007. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. *Infect. Immun.* 75, 3823–3832. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01335-06>.
- Rocha, H., Kirk, J.W., Healey Jr., C.D., 1971. Prolonged *Salmonella* bacteremia in patients with *Schistosoma mansoni* infection. *Arch. Intern. Med.* 128, 254–257. <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.1971.00310200090009>.
- Locksley, R.M., Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., Gardner Jr., K.D., 1987. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* 138, 744–749.
- Rogers, K.A., Titus, R.G., 2004. The human cytokine response to *Leishmania major* early after exposure to the parasite *in vitro*. *J. Parasitol.* 90, 557–563. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-3317>.
- Sabin, E.A., Araujo, M.L., Carvalho, E.M., Pearce, E.J., 1996. Impairment of tetanus toxoid-specific TH1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Infect. Dis.* 173, 269–272. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/173.1.269>.
- Sacks, D., Anderson, C., 2004. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol. Rev.* 201, 225–238. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00185.x>.
- Schubach, A.O., Marzochi, K.B., Moreira, J.S., Schubach, T.M., Araújo, M.L., Vale, A.C., Passos, S.R., Marzochi, M.C., 2005. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 213–217. <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822005000300001>.
- Silveira, F.T., Lainson, R., De Castro Gomes, C.M., Laurenti, M.D., Corbett, C.E., 2009. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 31, 423–431. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01116.x>.
- Soong, L., Henard, C.A., Meby, P.C., 2012. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Semin. Immunopathol.* 34, 735–751. <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-012-0350-8>.
- Soulsby, E.J., 1987. The evasion of the immune response and immunological unresponsiveness: parasitic helminth infections. *Immunol. Lett.* 16, 315–320.
- Souza, M.A., Castro, M.C., Oliveira, A.F., Almeida, A.F., Reis, L.C., Silva, C.J., Brito, M.E., Pereira, V.R., 2012. American tegumentary leishmaniasis: cytokines and nitric oxide in active disease and after clinical cure, with or without chemotherapy. *Scand. J. Immunol.* 76, 175–180. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2012.02717.x>.
- Souza, W.J., Sabroza, P.C., Santos, C.S., de Sousa, E., Henrique, M.F., Coutinho, S.G., 1992. Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. *Acta Trop.* 52, 111–119. [http://dx.doi.org/10.1016/0001-706X\(92\)90026-T](http://dx.doi.org/10.1016/0001-706X(92)90026-T).
- Su, Z., Segura, M., Stevenson, M.M., 2006. Reduced protective efficacy of a blood-stage malaria vaccine by concurrent nematode infection. *Infect. Immun.* 2006, 2138–2144. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.74.4.2138-2144.2006>.
- Taylor, M.D., van der Werf, N., Maizels, R.M., 2012. T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. *Trends Immunol.* 33, 181–189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.01.001>.
- Tuon, F.F., Gomes-Silva, A., Da-Cruz, A.M., Duarte, M.L., Neto, V.A., Amato, V.S., 2008. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. *Clin. Immunol.* 128, 442–446. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2008.05.007>.
- van den Bogaart, E., Berkhout, M.M., Nour, A.B., Mens, P.F., Talha, A.B., Adams, E.R., Ahmed, H.B., Abdelrahman, S.H., Ritmeijer, K., Nour, B.Y., Schallig, H.D., 2013. Concomitant malaria among visceral leishmaniasis in-patients from Gedarf and Sennar States, Sudan: a retrospective case-control study. *BMC Public Health* 13, 332. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-13-332>.
- van den Bogaart, E., Talha, A.B., Straetmans, M., Mens, P.F., Adams, E.R., Grobusch, M.P., Nour, B.Y., Schallig, H.D., 2014. Cytokine profiles amongst Sudanese patients with visceral leishmaniasis and malaria co-infections. *BMC Immunol.* 15, 16. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2172-15-16>.
- Vieira-Gonçalves, R., Pirmez, C., Jorge, M.E., Souza, W.J., Oliveira, M.P., Rutwitsch, M.S., Da-Cruz, A.M., 2008. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *Int. J. Dermatol.* 47, 926–932. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2008.03701.x>.
- Wilson, M.S., Maizels, R.M., 2004. Regulation of allergy and autoimmunity in helminth infection. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 26, 35–50.

5. DISCUSSÃO

O manejo das leishmanioses humanas deve considerar uma complexidade de fatores. Além de serem ofertadas poucas opções, os medicamentos disponíveis apresentam limitações e uma ampla diversidade de efeitos adversos. Os antimoniais pentavalentes constituem a primeira opção para o tratamento e, apesar da sua efetividade, observa-se variabilidade de respostas, as quais podem estar associadas a fatores do parasito e do hospedeiro. Com relação ao parasito, podemos citar as diferentes espécies de *Leishmania* causadoras da LTA. Já com relação ao hospedeiro, aspectos do status imunológico e a presença de coinfeções são fatores importantes que podem modular e/ou alterar não somente a resposta terapêutica, mas também o curso clínico da doença (Romero et al., 2001; Ameen et al., 2010; Supali et al., 2010; Krunchten et al., 2014). Devido a este cenário, nosso estudo buscou avaliar alguns desses fatores em um grupo de pacientes tratados com baixa dose de antimonial pentavalente.

Nosso estudo envolveu 217 pacientes com LTA, oriundos de diferentes regiões brasileiras, atendidos no LaPCLinVigiLeish. Inicialmente buscamos investigar a influência da espécie de *Leishmania* e da variabilidade genética de *L. Braziliensis* comparando dados de 108 pacientes tratados com baixa dose (5mg) de antimonial pentavalente oriundos de diferentes regiões do Brasil. Nossos resultados mostraram que *L. Braziliensis* foi a espécie prevalente, corroborando achados de outros estudos que indicam ser essa espécie a principal responsável pela LTA no Brasil (Brasil, 2013; Ferreira et al. 2015). Pudemos verificar que pacientes infectados por *L. braziliensis*, independente da região geográfica brasileira, responderam de forma satisfatória ao tratamento com antimonial pentavalente quando administrado em baixa dose. Esses resultados deram origem ao primeiro artigo desta tese. Posteriormente, buscamos verificar a influência da infecção por parasitos intestinais no curso clínico e terapêutico em 109 pacientes com LTA. Como resultado, verificamos que a

coinfecção por parasitos intestinais em geral, por helmintos, por nematódeos e por *Ascaris lumbricoides* foi associada com o desenvolvimento de lesões mucosas, e má resposta ao tratamento. Estes resultados deram origem ao segundo artigo desta tese.

No grupo de pacientes estudados no artigo 1, verificamos que o perfil clínico e sócio demográfico foi semelhante ao relatado em outros estudos (Brasil, 2013; Pontello et al., 2013; Marlow et al., 2013). A forma cutânea foi predominante 73%, ocorrendo principalmente no gênero masculino em uma faixa etária com média de 38 anos. As ocupações urbanas tiveram maior número de casos quando comparadas às atividades rurais, fato que pode ser explicado, em parte, pela mudança no padrão de transmissão da doença (Brasil, 2013) e, pelo fato do estudo ter sido conduzido em um Centro de Referência localizado em área urbana.

A prevalência de *L. braziliensis* no estado do Rio de Janeiro já foi apontada em diferentes estudos (Baptista et al., 2009; Fagundes et al., 2010; Oliveira et al. 2011). Contudo, duas espécies distintas (*L. guyanensis* e *L. amazonensis*) foram encontradas em pacientes que residiam no Rio de Janeiro, mas que adquiriram a infecção em outros estados. Este fato mostra a importância da identificação da espécie como auxílio para ações da vigilância epidemiológica. Aqui, também é importante mencionar que o aumento da atividade de turismo e/ou trabalho, verificado no Brasil, tem proporcionado a circulação de casos importados de LTA como já relatado para outras regiões do mundo (Pavli e Maltecou, 2010). Essas atividades favorecem a circulação de diferentes espécies de *Leishmania* e poderia viabilizar a instalação de surtos em áreas onde existam condições para a sua instalação. Azeredo-Coutinho et al. (2007) já identificaram um caso autóctone de *L. amazonensis* no Rio de Janeiro, onde até então, só haviam sido relatados casos de *L. braziliensis*. A presença autóctone de *L. guyanensis*, fora da região

Amazônica, ainda não foi relatada, mas, o alerta de pessoas infectadas com essa espécie de *Leishmania* no Rio de Janeiro é importante.

É discutido que a variabilidade genética seja um fator capaz de influenciar o desfecho terapêutico, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país (Romero et al., 2001; Jennings et al., 2014). Embora *L. braziliensis* seja a espécie prevalente no Brasil, sabe-se que a variabilidade genética dessa espécie é grande e diversa em função da área endêmica (Pacheco et al., 1990; Oliveira et al., 2013). Na região Sudeste, *L. braziliensis* apresenta um padrão genético homogêneo, com a presença de um único zimodema (Z27) (Ishikawa et al., 2002; Cupolillo et al., 2003), diferente do que ocorre nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, onde diferentes zimodemas são relatados para essa espécie (Cupolillo et al., 2003; Brito et al., 2009). Por conta disto, nossa expectativa era que pacientes infectados por *L. braziliensis* oriundos de outros estados (OE), pudessem ter um pior prognóstico terapêutico por conta dessa característica. No entanto, os resultados do artigo nº 1 apresentado nesta tese mostraram uma taxa de cura de 68% para o grupo RJ e de 80,5% para casos de OE, considerando o primeiro tratamento com 5mg Sb^V/Kg/Dia. Esse resultado sugere que, independentemente do polimorfismo presente, os casos de OE responderam satisfatoriamente ao tratamento com baixa dose de antimonial pentavalente. Este resultado é importante, pois o tratamento com baixa dose do medicamento promove a diminuição dos efeitos adversos, responsável por muitos casos de abandono no tratamento da doença, sendo mais seguro e gerando menos custos (Lyra, 2013; Saheki, 2013; Terceiro, 2014).

Em nosso estudo verificamos que a variabilidade genética nas amostras de *L. braziliensis* no grupo de OE foi maior do que no grupo do RJ e um dado importante foi o achado de duas variantes isoenzimáticas de *L. braziliensis* em pacientes oriundos do estado do Amazonas. Apesar desse resultado, ambos os pacientes evoluíram para a cura

no primeiro tratamento. Vale lembrar que o critério de falha terapêutica do Ministério da Saúde brasileiro envolve dois esquemas regulares consecutivos. Considerando o segundo tratamento, também realizado com baixa dose nos casos aqui estudados, essa taxa de cura sobe para 83% em pacientes do RJ e 92% para OE.

Dos dois pacientes infectados por *L. guyanensis* de OE, um não curou após o segundo tratamento. Esta é a segunda espécie predominante no País e mais prevalente na região Amazônica (Neves et al., 2011). É descrito na literatura que *L. guyanensis* responde melhor à pentamidina, devendo esta ser a medicação de escolha nesses casos (Couto et al., 2014). Apesar disso, o outro caso descrito, causado por *L. guyanensis*, apresentou cura no segundo tratamento com antimoniato de meglumina em baixa dose.

A caracterização etiológica foi um passo importante para o nosso estudo e um ponto limitante foi a dificuldade da identificação nos casos em que a amostra isolada tenha sido perdida, ou mesmo, quando o diagnóstico tenha sido dado por outro método, além da cultura. Nesses casos, tentamos recuperar o DNA em fragmentos de lesão, previamente impregnadas com parafina, para realização da PCR. Apesar de bons resultados relatados na literatura utilizando DNA extraído de amostras parafinadas (Lanús et al., 2005; De Lima et al., 2010), em nosso estudo não obtivemos sucesso. Esse fato pode ter sido influenciado pela baixa quantidade de DNA presente neste material, provocada pelos produtos utilizados no processo de inclusão da parafina que possivelmente degradam o ácido nucléico (De Lima et al., 2010).

Apesar da necessidade da exclusão de alguns pacientes de OE que retornaram aos seus estados de origem ou tinham área endêmica duvidosa, conseguimos recuperar e identificar através da técnica de isoenzimas (padrão ouro para identificação etiológica do gênero *Leishmania*) 93 isolados de 108 pacientes (86,1%).

Não foi possível associar dados clínicos ou demográficos aos casos de falha terapêutica, nem tampouco, associar a espécie *Leishmaniae*/ou variante de *L. braziliensis* com o desfecho clínico/terapêutico. Esses foram os principais resultados do artigo 1.

Além da espécie de *Leishmania*, investigada no primeiro artigo, outros parâmetros devem ser considerados como determinantes e/ou facilitadores na má resposta ao tratamento. Neste contexto, outro ponto a ser levado em consideração diz respeito à coinfeção, sobretudo por parasitos intestinais. Sabendo-se que a resposta imune na LTA é predominantemente tipo 1 e que esta é responsável pela resolução da doença, levantamos a hipótese de que uma possível resposta tipo 2, produzida por helmintos intestinais, poderia influenciar o curso clínico e terapêutico da LTA. Assim, estudamos um grupo de 109 pacientes cujos resultados compõem o artigo nº 2.

A coinfeção por parasitos intestinais muitas vezes é negligenciada, principalmente na vigência de doenças mais sérias como as leishmanioses. Os helmintos intestinais são altamente prevalentes em países tropicais e subtropicais, principalmente em populações pobres rurais, onde a distribuição coincide com as áreas de prevalência de leishmaniose. Muitas vezes ocorre uma exposição contínua, infecções por longos períodos e também o poliparasitismo (Almeida et al., 1999; Lessa et al., 2001; O'Neal et al., 2007).

Poucos estudos são encontrados correlacionando-se a infecção intestinal parasitária com a LTA, tendo-se poucas informações sobre possíveis influências no curso clínico e terapêutico da doença.

A população deste segundo artigo apresentou baixa prevalência da infecção por helmintos intestinais, o que pode ser explicado pelo fato do estudo ter sido conduzido em área metropolitana, ao contrário da alta prevalência (90%) encontrada na literatura

quando conduzido em área rural (O'Neal et al. 2007). Nossos resultados indicam que a coinfeção (*Leishmania* spp X helminto intestinal) foi um fator significativo, associado ao desenvolvimento de lesões mucosas e à baixa resposta ao tratamento. O mesmo não ocorreu com os casos coinfectados por protozoários.

Ascaris lumbricoides, juntamente com os ancilostomídeos, foram os helmintos mais encontrados nas infecções parasitárias intestinais no estudo. Esses parasitos induzem maior produção de várias citocinas que estão relacionadas à resposta tipo 2 (Cooper et al., 2000). A expansão de células T regulatórias é responsável por interferir na ativação de macrófagos que são células essenciais no controle da LTA (Castellano et al., 2009). Entretanto, ensaios *in vitro* empregando células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LC coinfectados por helmintos, não indicaram a diminuição de níveis de IFN- γ (O'Neal et al 2007). Esse dado indica que talvez a resposta produzida por helmintos não seja capaz de inibir a ativação de macrófago, devido à intensa estimulação antigênica da *Leishmania* spp. Talvez por esta razão, os pacientes de nosso estudo tenham apresentado lesões menores, pois apesar da presença da resposta tipo 2, ainda deve haver forte resposta tipo 1, com ativação de macrófagos e produção de lesões.

A presença de lesão mucosa é um fator complicador para o tratamento da LTA e, em nosso estudo, a coinfeção com helmintos intestinais estava mais associada ao desenvolvimento dessas lesões. No presente trabalho não foi feita a dosagem de citocinas e verificação de padrões imunes das células T, contudo já foi verificado que na LM ocorre um padrão misto de respostas (Th1 e Th2) (Pirmez et al., 1993; Amato et al., 2003). Mais estudos são necessários para elucidar o envolvimento da resposta imune, desenvolvimento de LM e a coinfeção por parasitos intestinais.

Como já mencionado, a LTA é um agravo complexo, sobretudo do ponto de vista clínico e terapêutico. Estabelecer possíveis fatores capazes de influenciar positivamente

ou negativamente esses dois parâmetros é importante para o manejo da doença. Conhecer as razões para a ocorrência de casos clínicos atípicos ou mesmo as razões para os eventos de falha terapêutica e/ou recidiva da doença ainda são desafios. Após a finalização deste estudo, embora não tenha sido possível associar a espécie de *Leishmania* ao desfecho terapêutico, podemos admitir que casos de LTA causados por *L. braziliensis* oriundos de diferentes áreas geográficas do Brasil responderam de forma satisfatória ao tratamento com antimonial pentavalente em baixa dose, mesmo quando comparados ao grupo do RJ, classicamente apontado como área de pouca variabilidade genética de parasitas que apresentam alta suscetibilidade ao antimonial pentavalente. Esse dado, mesmo que limitado ao grupo estudado, pode indicar que o esquema de baixa dose de antimonial pentavalente, utilizado há vários anos no RJ, poderia ser estendido para outras regiões do Brasil. Já com relação ao parasitismo intestinal, verificamos que a infecção por helmintos exerce uma influência deletéria no curso clínico e terapêutico na LTA. A importância da pesquisa parasitológica em amostras de fezes em pacientes acometidos pela LTA ainda é pouco conhecida e por conta disso, negligenciada. No entanto, de acordo com os resultados aqui apresentados, é um fator que merece atenção durante o manejo do paciente.

6. CONCLUSÕES

1. *Leishmania braziliensis* foi a espécie prevalente, independente da região geográfica brasileira dos pacientes estudados;
2. Não houve associação das variáveis clínicas, demográficas e epidemiológicas com a resposta terapêutica da LTA;
3. Não foi possível associar a espécie do parasito e/ou variabilidade genética de *L. braziliensis* ao desfecho terapêutico nos pacientes estudados, não importando a procedência dos pacientes, sugerindo que o esquema terapêutico de baixa dose de antimonial pentavalente poderia ser eficaz mesmo em outras regiões do Brasil, além do Rio de Janeiro;
4. A coinfeção por parasitos intestinais, sobretudo os helmintos, esteve associada com desenvolvimento de lesão mucosa e má resposta à terapia na LTA.

7. REFERÊNCIAS

- Ait-Oudhia K, Gazanion E, Vergnes B, Oury B, Sereno D. Leishmania antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitol Res.* 2011; 109: 1225-32.
- Alexander J, Vickerman K. Fusion of cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* infected macrophages. *J Protozool.* 1975; 22: 502-508.
- Amato VS, Andrade HF, Amato Neto V, Duarte MI. Short report: persistence of tumor necrosis factor-alpha in situ after lesion healing in mucosal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 May; 68: 527-8.
- Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol.* 2010; 35: 699-705.
- Andrade BB, Boaventura V, Barral-Netto M, Barral A. Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e Perspectivas. *Gaz méd Bahia.* 2005; 75: 75-82.
- Antinori S, Gianelli E, Calattini S, Longhi E, Gramiccia M, Corbellino M. Cutaneous leishmaniasis: an increasing threat for travellers. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11: 343-6.
- Antonio LdeF, Fagundes A, Oliveira RV, Pinto PG, Bedoya-Pacheco SJ, Vasconcellos EdeC, Valet-Rosalino MC, Lyra MR, Passos SR, Pimentel MI, Schubach AdeO. Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014 Sep-Oct; 56: 375-80.
- Arevalo J, Ramirez L, Adai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Vera C et al. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in

- patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2007; 195: 1846–1851.
- Azeredo-Coutinho RB, Mendonça SC. An intermittent schedule is better than continuous regimen of antimonial therapy for cutaneous leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002 Sep-Oct; 35: 477-81.
- Bailey MS, Lockwood DN. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 2007; 25: 203-11.
- Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro-de-Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. *Infect Immun.* 2002 Dec; 70: 6734-40.
- Baptista C, Miranda LdeF, Madeira MdeF, Leon LL, Conceição-Silva F, Schubach Ade O. In vitro sensitivity of paired *Leishmania (Viannia) braziliensis* samples isolated before meglumine antimoniate treatment and after treatment failure or reactivation of cutaneous leishmaniasis. *Dis Markers.* 2015; 2015: 943236
- Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, Conceição-Silva F, Rosalino CM, Salgueiro MM, Pacheco RS. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: Evaluation by two molecular markers. *Exp Parasitol.* 2009; 121: 317-322.
- Basano SA, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Bras Epidemiol.* 2004: 328-37.
- Basselin M, Badet-Denisot MA, Lawrence F, Robert-Gero M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated, and pentamidine-resistant *Leishmania*. *Exp Parasitol.* 1997 Mar; 85: 274-82.

- Bedoya-Pacheco SJ, Araujo-Melo MH, Valete-Rosalino CM, Pimentel MI, Conceição-Silva F, Schubach AO, Marzochi MC. Endemic tegumentary leishmaniasis in Brazil: correlation between level of endemicity and number of cases of mucosal disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Jun; 84: 901-5.
- Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: Biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. *Rev Infect Dis.* 1988; 10: 560-586.
- Berman JD, Chulay JD, Hendricks LD, Oster CN. Susceptibility of clinically sensitive and resistant *Leishmania* to pentavalent antimony in vitro. *Am J Trop Med Hyg.* 1982; 31: 459-65.
- Bermúdez H, Rojas E, Garcia L, Desjeux P, Dujardin JC, Boelaert M, Chappuis F. Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. *Ann Trop Med Parasitol.* 2006; 100: 591–600.
- Brasil, 2013. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 3rd ed. Ministério da Saúde, Brasília (DF).
- Brewster S, Barker DC. Analysis of minicircles classes in *Leishmania* (*Viannia*) species. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96: S55-S63.
- Brito MEF, Andrade MS, Mendonça MG, Silva CJ, Almeida EL, Lima BS et al. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Trop Med Int Health.* 2009; 1278-1286.
- Chang KP, Dwyer DM. Multiplication of a human parasite (*L. Donovanii*) in phagolysosomes of hamster macrophages “in vitro”. *Science* 1976; 193: 678-679.

- Conceição-Silva F, Morgado FN, Coutinho SG. Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Conceição-Silva F, Alves CR, editores. Leishmanioses do Continente Americano Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. p.357-379.
- Cooper PJ, Chico ME, Sandoval C, Espinel I, Guevara A, Kennedy MW, Urban Jr JF, Griffin GE, Nutman TB. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with a polarized cytokine response. *J Infect Dis.* 2000 Oct; 182: 1207-13.
- Couto DV, Hans Filho G, Medeiros MZ, Vicari CF, Barbosa AB, Takita LC. American tegumentary leishmaniasis – a case of therapeutic challenge. *An. Bras Dermatol.* 2014 Nov-Dec; 89: 974-6.
- Cupolillo E, Brahin LR, Toaldo CB, de Olivegeira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A, de Farias Naiff M, Grimaldi G Jr. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 3126-3132.
- Da-Cruz AM, Machado ES, Menezes JA, Rutowitsch MS, Coutinho SG. Cellular and humoral immune responses of a patient with American cutaneous leishmaniasis and AIDS. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992 Sep-Oct; 86: 511-2.
- de Lima, AC, Zampieri RA, Tomokane TY, Laurenti MD, Silveira FT, Corbett CE, Gomes CM. *Leishmania* sp. identification by PCR associated with sequencing of target SSU rDNA in paraffin-embedded skin samples stored for more than 30 years. *Parasitol Res.* 2011; 108: 1525-31.
- Delobel P, Launois P, Djossou F, Sainte-Marie D, Pradinaud R. American cutaneous leishmaniasis, lepromatous leprosy, and pulmonary tuberculosis coinfection with downregulation of the T-helper 1 cell response. *Clin Infect Dis.* 2003; 37: 628–633.

- Fagundes A, Schubach A, Paula CC, Bogio A, Antonio Lde F, Schiavoni PB, Monteiro VdeS, Madeira MdeF, Quintella LP, Valete-Rosalino CM, Vasconcellos EdeC, Azeredo-Coutinho RB, Pacheco RS, Marzochi MC, Marzochi KB. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105: 109-12.
- Falqueto A, Lessa PA. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Tratado de Infectologia*. Vol 2, São Paulo, Atheneu, 1997; p.1221-1230.
- Ferreira LT, Gomes AH, Pereira-Chiocola VL. Genotype characterization of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* isolated human and canine biopsies with American cutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015 May-Jun; 57: 257-62.
- Golino A, Duncan JM, Zeluff B, DePriest J, McAllister HA, Radovancevic B, Frazier OH. Leishmaniasis in a heart transplant patient. *J Heart Lung Transplant*. 1992 Jul-Aug; 11: 820-3.
- Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010 Apr; 8: 419-33.
- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson AD. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*. 2002 Aug; 2: 494-501.
- Hodiamont CJ, Kager PA, Bart A, de Vries HJ, van Thiel PP, Leenstra T, de Vries PJ, van Vugt M, Grobusch MP, van Gool T. Species-directed therapy for leishmaniasis in returning travellers: a comprehensive guide. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 May 1; 8: e2832.
- Hommel H. The genus *Leishmania*: Biology of the parasites and clinical aspects. *Bull Institut Pasteur* 1978; 75: 5-102.

- Ishikawa EA, Silveira FT, Magalhaes AL, Guerra junior RB, Melo MN, Gomes R, Silveira TG, Shaw JJ. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96: S111-21.
- Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, Carvalho EM. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 86: 426-33.
- Kruchten SD, Bacon KM, Lee BY. The Impact of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Co-Infection on the Economic Burden of Cutaneous Leishmaniasis (CL) in Brazil and Potential Value of New CL Drug Treatments. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; 91: 520–527.
- Kuhls K, Cupolillo E, Silva SO, Schweynoch C, Boité MC, Mello MN, Mauricio I, Miles M, Wirth T, Schönian G. Population structure and evidence for both clonality and recombination among Brazilian strains of the subgenus *Leishmania (Viannia)*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Oct 31; 7: e2490.
- Lyra, MR. Ensaio Clínico Fase III para Leishmaniose Tegumentar Americana. Equivalência entre Esquemas de Alta e Baixa Dose de Antimoniato de Meglumina. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado Ciências] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas; 2013.
- Jennings YL, de Souza AA, Ishikawa EA², Shaw J, Lainson R, Silveira F. Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania (Viannia) guyanensis* · *Leishmania (Viannia) shawi shawi*. *Parasite.* 2014; 21: 39

- Laguna F. Treatment of leishmaniasis in HIV-positive patients. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003; 97: S135–S142.
- Lanús EC, Piñero JE, González AC, Valladares B, de Grosso ML, Salomón OD,. Detection of *Leishmania braziliensis* in human paraffin-embedded tissues from Tucumán, Argentina by polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100: 187-92.
- Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho EM. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Aug; 65: 87-9.
- Machado P, Araujo C, Da Silva AT, et al. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin Infect Dis.* 2002; 34: E69–73.
- Mendonça MG, de Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis.* 2004; 189: 1018-23.
- Markle WH, Makhoul K, Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *Am Fam Physician.* 2004; 69: 1455–1460.
- Marlow MA, Mattos MS, Makowiecky ME, Eger I, Rossetto AL, Grisard EC, Steindel M. Divergent Profile of Emerging Cutaneous Leishmaniasis in Subtropical Brazil: New Endemic Areas in the Southern Frontier. *PLoS ONE.* 2013; 8: e56177.
- Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniases in Brazil: emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica.* 1994; 10: 359-75.

- Matos DS, Azeredo-Coutinho RB, Schubach A, Conceição-Silva F, Baptista C, Moreira JS, Mendonça SC. Differential interferon-gamma production characterizes the cytokine responses to *Leishmania* and *Mycobacterium leprae* antigens in concomitant mucocutaneous leishmaniasis and lepromatous leprosy. *Clin Infect Dis*. 2005; 40: e5-12.
- Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem*. 2007; 14: 1153-69.
- Neves LO, Talhari AC, Gadelha EP, Silva Júnior RM, Guerra JA, Ferreira LC, Talhari S. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol*. 2011 Nov-Dec; 86: 1092-101.
- Newlove T, Guimarães LH, Morgan DJ, Alcântara L, Glesby MJ, Edgar M, Carvalho EM, Machado PR. Antihelminthic Therapy and Antimony in Cutaneous Leishmaniasis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Patients Co-Infected with Helminths and *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 84: 551–555.
- Oliveira FS, Valete-Rosalino CM, Pacheco SJ, Costa FA, Schubach AO, Pacheco RS. American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*: assessment of parasite genetic variability at intra- and inter-patient levels. *Parasit Vectors*. 2013 Jun; 6: 189.
- Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop*. 2011; 118: 87-96.
- Oliveira-Neto, MP, Mattos M, Pirmez C, Fernandes O, Gonçalves-Costa SC, Souza CFS, Grimaldi Junior G. Mucosal leishmaniasis (“espundia”) responsive to low dose of N-

methyl glucamine (Glucantime ®) in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2000; 42: 321-325.

Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Souza CSF, Fernandes O, Pirmez C. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 1998; 37: 846-849.

Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C. Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis: a Comparison between Low Dosage (5mg/kg/day) and High Dosage (20mg/Kg/day) Antimony Regimens. *Pathol Biol*. 1997a; 45: 496-499.

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; 57: 651–655.

Oliveira Neto MP, Marzochi MC, Grimaldi Júnior G, Pacheco RS, Toledo LM, Momen H. Concurrent human infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1986 Dec; 80: 5870-92.

O'Neal SE, Guimarães LH, Machado PR, Alcântara L, Morgan DJ, Passos S, Glesby MJ, Carvalho EM. Influence of helminth infections on the clinical course and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2007 Jan 1;195: 142-8.

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

Pfaff AW, Candolfi E. Immune responses to protozoan parasites and its relevance to diagnosis in immunocompromised patients. *Europ J Protistol*. 2003; 39: 428–434.

- 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; 64:187–193.
- Pavli A, Maltezou HC. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *Int J Infect Dis.* 2010; 14: e1032-9.
- Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest.* 1993 Apr; 91: 1390-5.
- Pontello R Jr, Gon AS, Ogama A. American cutaneous leishmaniasis: epidemiological profile of patients treated in Londrina from 1998 to 2009. *An Bras Dermatol.* 2013; 88: 748-53
- Rabello A, Orsini M, Disch J. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003; 97: 17–28.
- Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31: 143–148.
- Rodrigues AM, Hueb M, Santos TA, Fontes CJ. Factors associated with treatment failure of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimonate. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006 Mar-Apr; 39: 139-45.
- Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macêdo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimonate. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Nov; 65: 456-65.

- Ronet C, Ives A, Bourreau E, Fasel N, Launois P, Masina S. Immune responses to *Leishmania guyanensis* infection in humans and animal models. In: Jirillo E, Brandonisio O, Eds. *Immune Response to Parasitic Infections: Protozoa*. Bussum: Bentham Books 2010; 165-77.
- Saheki, MN. Ensaio clínico de não inferioridade, randomizado, controlado, cego, de antimoniatado de meglumina em dose baixa versus dose alta para leishmaniose cutânea americana no Rio de Janeiro, Brasil. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado Ciências] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas; 2013.
- Schriefer A, Schriefer AL, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun*. 2004 Jan; 72: 508-14.
- Schriefer A, Guimarães LH, Machado PRL, Lessa M, Lessa HA, Lago E et al. Geographic Clustering of Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009; 871-876.
- Schubach AO, Marzochi KBF, Moreira JS, Schubach TMP, Araújo ML, Do Vale ACF, Passos SRL, Marzochi MCA. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38: 213-217.
- Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraeve W, Pirmez C, Grimaldi G Jr, Fernandes O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis*. 1998 Sep; 178: 911-4.
- Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, de Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Araújo ML, Souza WJ, Haddad F, Perez Mde A, Pacheco RS, Momen H, Coutinho SG,

de Almeida Marzochi MC, Marzochi KB, da Costa SC. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Oct; 96: 987-96.

Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CEP. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2009; 31: 423–431.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação [homepage na internet]. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2014 [acesso em 12 jan 2016]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br>

Souza AS, Giudice A, Pereira JM, Guimaraes LH, de Jesus AR, de Moura TR, et al. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF alpha production. *BMC Infect Dis*. 2010; 10: 209.

Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, Kumar PC, Murray HW. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis*. 2000 Oct; 31: 1104-7.

Supali T, Verweij JJ, Wiria AE, Djuardi Y, Hamid F, Kaisar MMM, Wammes LJ, van Lieshout L, Luty AJ, Sartono E, Yazdanbakhsh M. Polyparasitism and its impact on the immune system. *Int J Parasitol*. 2010 Aug; 40: 1171-6.

Teixeira AC, Paes MG, Guerra JO, Prata A, Silva-Vergara ML. Failure of both azithromycin and antimony to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008; 50: 157–160.

Terceiro, BRF. Comparação entre o esquema padrão e alternativo com antimoniato de meglumina no tratamento da Leishmaniose mucocutânea e mucosa. Rio de Janeiro.

Dissertação [Mestrado Ciências] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas; 2014.

Torres DC, Ribeiro-Alves M, Romero AS, Dávila AMR, Cupolillo E. Assessment of drug resistance related genes as candidate markers for treatment outcome prediction of cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.* 2013; 126: 132–141.

Van DenBogaart E, Talha AB, Straetemans M, Mens PF, Adams ER., Grobusch, MP, Nour BY, Schallig HD, Cytokine profiles amongst Sudanese patients with visceral leishmaniasis and malaria co-infections. *BMC Immunol.* 2014; 15:16,

Van DenBogaart E, Berkhout MM, Nour AB, Mens, PF, Talha AB, Adams ER, Ahmed HB, Abdelrahman SH, Ritmeijer K, Nour BY, Schallig HD. Concomitant malaria among visceral leishmaniasis in-patients from Gedarif and Sennar States, Sudan: a retrospective case-control study. *BMC Public Health.* 2013; 13: 332.

Van Griensven J, Carrillo E, Lopez-Velez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in immune suppressed individuals. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20: 286–299.

Vasconcellos EdeC, Pimentel MI, Schubach AdeO, de Oliveira RdeV, Azeredo-Coutinho RB, Silva FdaC, Salgueiro Mde M, Moreira JS, Madeira MdeF, Baptista C, Valet-Rosalino CM. Intralesional meglumine antimoniate for treatment of cutaneous leishmaniasis patients with contra indication to systemic therapy from Rio de Janeiro (2000 to 2006). *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87: 257-60.

Vergel C, Palacios R, Cadena H, Posso CJ, Valderrama L, Perez M, Walker J, Travi BL, Saravia NG. Evidence for leishmania (viannia) parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. *J Infect Dis.* 2006 Aug; 194: 503-11.

Vianna GO. *Anais do 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia* 1912, 4, 426.

- Vinson R, 2010. Application for inclusion of Miltefosine on WHO Model List of Essential Medicines. Quebec, Canada: PaladinLabs, 21.
- Von Stebut, EJ. Leishmaniasis. *Dtsch Dermatol Ges.* 2015 Mar; 13: 191-200.
- Weigle KA, Valderrama L, Santrich C, Saravia NG. Recurrences of tegumentary leishmaniasis. *Lancet.* 1985 Sep 7; 2: 557-8.
- World Health Organization. Technical Report Series 949. Control of the leishmaniasis. Geneva, 186 p. 2010.
- Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Doncker SD, Ramirez L, Croft S, Arevalo J, Adai V, Bermudez H, Decuypere S, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *J Infect Dis.* 2006 Oct; 194: 1168-75.

ANEXO

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: ESTUDO DE ASPECTOS DO PARASITO E SUA CORRELAÇÃO COM A RESPOSTA CLÍNICA E TERAPÊUTICA EM CASOS DE DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS, ATENDIDOS NO

Pesquisador: Maria de Fatima Madeira

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 2

CAAE: 18473213.5.0000.5262

Instituição Proponente: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC / FIOCRUZ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: Relatório Parcial 1º semestre de 2015

Data do Envio: 09/10/2015

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.371.602

Apresentação da Notificação:

Trata-se de NOTIFICAÇÃO referente a Relatório Parcial do projeto, CAAE 18473213.5.0000.5262, aprovado pelo CEP em reunião de 12/08/2013 - Parecer nº 364.055, datado de 19/08/2013.

Objetivo da Notificação:

Apresentação do Relatório Parcial do 1º Semestre de 2015

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Permanecem os mesmos descritos no Parecer do CEP nº 364.055.

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 1.371.602

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

O estágio atual do projeto é 'analisando e escrevendo resultados. O cronograma físico de execução está sendo cumprido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Satisfatórios.

Recomendações:

A pesquisadora principal deverá relatar ao CEP INI/Fiocruz a publicação de artigos oriundos do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O relatório foi apresentado de forma adequada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Esta aprovação será referendada pelo Colegiado no dia 18/01/2016.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	Relatorio_Parcial_Jamyra.pdf	09/10/2015 14:26:47	Maria de Fatima Madeira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 16 de Dezembro de 2015

Assinado por:
Mauro Brandão Carneiro
(Coordenador)

Dr. Mauro Brandão Carneiro
Vice-Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC/FIOCRUZ
Mat. Slape: 463.499-3

Endereço: Avenida Brasil 4365
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3865-9585 E-mail: cep@pec.fiocruz.br