

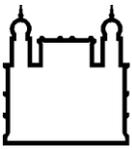
Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

INFLUÊNCIA DO GRAU DE SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS DE
LEISHMANIA (VIANNIA) GUYANENSIS AO ANTIMONIAL
PENTAVALENTE E A PENTAMIDINA NA FALHA TERAPÊUTICA DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA

CLEBIO ELEUTERIO DA SILVA

Rio de Janeiro
Abril de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

CLEBIO ELEUTERIO DA SILVA

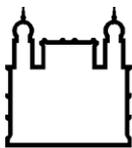
Influência do grau de susceptibilidade de isolados de *Leishmania (Viannia) guyanensis* ao antimonial pentavalente e a pentamidina na falha terapêutica de pacientes com leishmaniose cutânea

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Orientador (es): Prof^a. Dr. Adriano Gomes da Silva
Prof^a. Dra. Alda Maria Da-Cruz

RIO DE JANEIRO

Abril de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: CLEBIO ELEUTERIO DA SILVA

INFLUÊNCIA DO GRAU DE SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS DE *LEISHMANIA (VIANNIA) GUYANENSIS* AO ANTIMONIAL PENTAVALENTE E A PENTAMIDINA NA FALHA TERAPÊUTICA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA

ORIENTADOR (ES): Prof.º. Dr. Adriano Gomes da Silva

Prof.ª. Dra. Alda Maria Da-Cruz

Aprovada em:

EXAMINADORES:

Prof. Dr.Tania Zaverucha do Valle - Presidente Revisora(IOC/Fiocruz)

Prof.ª. Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva (UERJ-RJ)

Prof.ª. Dr. Wallace Pacienza Lima (UFRJ)

Prof. Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral - Suplente (IOC/Fiocruz)

Prof.ª. Dra.Patricia Maria Lourenço Dutra – Suplente (UERJ)

Rio de Janeiro, 27 de Abril de 2017.

Silva, Clebio Eleuterio da.

INFLUÊNCIA DO GRAU DE SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS DE LEISHMANIA (VIANNIA) GUYANENSIS AO ANTIMONIAL PENTAVALENTE E À PENTAMIDINA NA FALHA TERAPÊUTICA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA / Clebio Eleuterio da Silva. - Rio de Janeiro, 2017. 56 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientador: Adriano Gomes da Silva.

Co-orientadora: Alda Maria da Cruz.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Leishmania (Viannia) guyanensis. 2. Falha terapêutica. 3. Susceptibilidade aos fármacos. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

À Deus. Aos meus pais, Antonio (*in memoriam*) e Maria. Aos meus irmãos, FrancoNero, José Ricardo, Edson e Kenia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido o dom da vida e por ter me levado a lugares inimagináveis, me abençoando com uma família e com amigos que estão sempre ao meu lado.

Agradeço aos meus pais, pois sem eles nada disso seria possível. À minha mãe, Maria, por sempre ter lutado e persistido para o meu bem, sempre me incentivando a buscar o melhor. Meu pai, Antonio (*in memoriam*), por sempre batalhar pela nossa educação. À minha irmã, Kenia, por me apoiar, me aconselhar nos momentos em que mais precisei. Aos meus irmãos e sobrinhos, que sempre demonstraram ter tanto orgulho das minhas conquistas, e que foram essenciais na formação do meu caráter.

Agradeço aos meus orientadores, Adriano Gomes, Alda Maria e Valter Vianna por terem me recebido e dado a dedicação necessária que precisei. Agradeço em especial ao Dr Adriano Gomes e ao Dr Valter Viana por terem confiado em me orientar e por ser acima de tudo grandes amigos e alguém ao qual me orgulho em se espelhar.

Agradeço imensamente a todos os meus amigos do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas e do Laboratório de bioquímica de Tripanossomatídeos, por sempre se mostrarem tão acolhedores, amigáveis e companheiros, e por sempre estarem dispostos a ajudar em experimentos, discussões científicas e etc.

A toda equipe da Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado - Manaus por colaborarem sempre com muita dedicação com este projeto, através dos serviços de captação de pacientes e doação dos isolados para a realização deste trabalho.

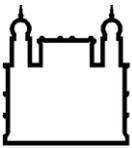
Aos membros da banca examinadora que prontamente aceitaram o convite, mesmo em meio a um curto período de tempo; com certeza todos serão indispensáveis para o crescimento do trabalho.

Agradeço a todos os pacientes que sofrem destas enfermidades e aceitaram colaborar e participar deste estudo, mesmo sabendo que o estudo poderia não beneficiá-los diretamente. Muito obrigado por confiarem na pesquisa e na medicina para continuarem lutando por suas vidas.

Ao auxílio CNPq para financiamento do projeto, sem o qual este trabalho não poderia estar sendo realizado. Da mesma maneira, ao IOC.

A Capes pela concessão da bolsa de mestrado (2015-2017).

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original. (Albert Einstein)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

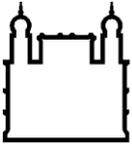
INFLUÊNCIA DO GRAU DE SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS DE LEISHMANIA (VIANNIA) GUYANENSIS AO ANTIMONIAL PENTAVALENTE E À PENTAMIDINA NA FALHA TERAPÊUTICA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

CLEBIO ELEUTERIO DA SILVA

Introdução: A leishmaniose cutânea é uma doença dermatológica, caracterizada por diferentes manifestações clínicas, constituindo uma doença negligenciada e um grave problema de saúde pública. A região norte do Brasil registra cerca de 37,3% dos casos, principalmente no estado do Amazonas onde a espécie *Leishmania (Viannia) guyanensis* é a mais prevalente causadora de leishmaniose cutânea. Tem sido observado que o tratamento desses casos com antimonial pentavalente (Sb^V) ou pentamidina apresenta índices de cura que variam entre 26,3% e 73,2% para o antimonial e de 58,1% a 71% para a pentamidina. **Hipótese:** Os episódios de falha terapêutica podem estar relacionados a uma menor susceptibilidade do parasito aos fármacos leishmanicidas. **Objetivo geral:** Investigar a associação entre o grau de susceptibilidade de isolados de *L. (V.) guyanensis* frente aos fármacos leishmanicidas e o desfecho clínico após tratamento dos pacientes com LTA provenientes de Manaus. **Material e métodos:** Foram estudados nove isolados de *L. (V.) guyanensis* obtidos de pacientes de leishmaniose cutânea acompanhados na Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado/Manaus-AM. Estes foram classificados em quatro grupos: a) isolados de pacientes cujos desfechos clínicos foram o sucesso terapêutico quando tratados com antimonial pentavalente (ST- Sb^V , n=2); b) desfechos clínicos foram a falha terapêutica (FT- Sb^V , n=4); c) isolado de paciente cujo desfecho clínico foi o sucesso terapêutico quando tratado com pentamidina (ST-Pentamidina, n=1); d) desfechos clínicos foram a falha terapêutica (FT-Pentamidina, n=2). Para a inibição em 50% do crescimento de formas promastigotas, foram utilizadas em cultura diferentes concentrações de Sb^{III} (0 μM a 200 μM) e pentamidina (0 μM a 6 μM). A quantificação da taxa de crescimento foi medida pelo método colorimétrico da rezasurina (Alamar Blue®). **Resultados:** A IC_{50} variou de 6,98 a 61,31 μM quando os isolados foram tratados com Sb^{III} , e de 0,09 a 0,89 μM quando os isolados foram expostos à pentamidina. Foi observado que dentre os isolados de *L. guyanensis* provenientes de pacientes tratados com Sb^V e que evoluíram clinicamente com falha terapêutica, dois (002/16 e 005/16) de um total de quatro isolados, necessitaram de uma concentração do Sb^{III} 1,8 a 2,6 vezes maior que a de isolados provenientes de pacientes que evoluíram com cura clínica (001/16 e 004/16) ($p < 0,05$), para inibir 50% do crescimento de formas promastigotas *in vitro* (IC_{50}). **Discussão e Conclusão:** O ensaio de sensibilidade aos fármacos leishmanicidas *in vitro* embora não ter sido 100% correlato ao desfecho clínico dos pacientes nos permitiu observar que alguns dos isolados apresentam menor sensibilidade ao antimonial pentavalente. Essa característica pode contribuir, pelo menos em parte, para alguns dos episódios de falha terapêutica. Por outro lado, vale ressaltar que outros parâmetros inerentes ao hospedeiro também podem estar associados aos episódios de falha terapêutica.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INFLUENCE OF THE LEVEL OF SUSCEPTIBILITY OF *LEISHMANIA (VIANNIA) GUYANENSIS* ISOLATES TO PENTAVALENT ANTIMONIAL AND PENTAMIDINE IN THE THERAPEUTIC FAILURE OF PATIENTS WITH CUTANEOUS LEISHMANIOSIS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

CLEBIO ELEUTERIO DA SILVA

Introduction: Cutaneous leishmaniasis (CL) is a dermatological disease, characterized by several clinical manifestations, constituting a neglected disease and a serious public health problem. The northern region registers 37.3% of the Brazilian cases of CL, mainly in the state of Amazonas where the species *Leishmania (Viannia) guyanensis* is the most prevalent cause of cutaneous leishmaniasis. It has been observed that the treatment of these cases with pentavalent antimonial (Sb^V) or pentamidine has cure rates ranging from 26.3% to 73.2% for antimonial and from 58.1% to 71% for pentamidine. **Hypothesis:** The episodes of therapeutic failure may be related to a lower susceptibility of the parasite to leishmanicidal drugs. **Objective:** To investigate the association between the susceptibility level of *L. (V.) guyanensis* isolates against leishmanicidal drugs and the clinical outcome after treatment of patients with CL from Manaus. **Material and methods:** Nine isolates of *L. (V.) guyanensis* obtained from LC patients at Heitor Vieira Dourado / Manaus-AM Tropical Medicine Foundation were studied. These were classified into four groups: A) isolates from patients whose clinical outcomes were therapeutic success when treated with pentavalent antimonial (TS- Sb^V , n = 2); B) clinical outcomes were the therapeutic failure (TF- Sb^V , n = 4); C) isolated from a patient whose clinical outcome was the therapeutic success when treated with pentamidine (TS-Pentamidine, n = 1); D) clinical outcomes were the therapeutic failure (TF-Pentamidine, n = 2). To inhibiting in 50% the growth of promastigote forms, different concentrations of antimonial trivalent (Sb^{III}) (0 μ M to 200 μ M) and pentamidine (0 μ M to 6 μ M) were used in culture. Quantification of growth rate were measured by the colorimetric method of rezasurine (Alamar Blue®). **Results:** The IC_{50} ranged from 6.98 to 61.31 μ M when the isolates were treated with Sb^{III} , and from 0.09 to 0.89 μ M when the isolates were exposed to pentamidine. It was observed that among *L. guyanensis* isolates from patients treated with Sb^V that clinically evolve to therapeutic failure, two (002/16 and 005/16) out of a total of four isolates presented an IC_{50} to Sb^{III} , 1.8 to 2.6 times greater than the isolates from patients that evolved to clinical cure (001/16 and 004/16) ($p < 0.05$), to inhibit 50% growth of promastigote forms *in vitro* (IC_{50}). **Discussion and Conclusion:** The sensitivity test for leishmanicide drugs *in vitro*, although not 100% correlated with the clinical outcome of the patients, allowed us to observe that some of the isolates have a lower sensitivity to pentavalent antimonial. This feature may contribute, at least in part, to some of the episodes of therapeutic failure. On the other hand, it is worth mentioning that other parameters inherent to the host can also be associated to the episodes of therapeutic failure.

ÍNDICE

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE QUADRO	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
1. Introdução	15
1.1 - Leishmaniose tegumentar Americana	16
1.1.1- Forma cutânea	17
1.1.2- Forma mucosa	17
1.1.3- Forma difusa	18
2. Epidemiologia da LTA	18
3. Tratamento da LTA	20
3.1 Antinomiato de meglumina	21
3.2 Anfotericina B	22
3.3 Pentamidina	22
4. Critérios de cura e falha terapêutica na LTA	23
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo Geral	24
5.2 Objetivos específicos	24
6. MATERIAL E MÉTODOS	24
6.1 Considerações Éticas	24
6.2 Casuística	24
6.3 Critérios de inclusão	25
6.4. Obtenção dos isolados de <i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	25
6.5. Delineamento do estudo	28
6.6 Ensaio para avaliação <i>in vitro</i> da susceptibilidade de formas promastigotas aos fármacos leishmanicidas	28

6.7 Ensaio para avaliação <i>in vitro</i> da susceptibilidade de formas amastigotas ao antimonial pentavalente e à pentamidina com linhagem celular THP-1	29
6.7.1 Avaliação por microscopia óptica para determinar a taxa e índice de infecção dos isolados de <i>Leishmania guyanensis</i>	29
6.8 Ensaio para avaliação <i>in vitro</i> da susceptibilidade de formas amastigotas ao antimonial pentavalente e à pentamidina com macrófagos peritoneais murinos	32
6.8.1 Coleta e plaqueamento dos macrófagos murinos	32
6.8.2 Infecção dos macrófagos	32
6.9 Análise estatística	33
7. RESULTADOS	33
7.1 Análise da sensibilidade <i>in vitro</i> dos isolados de <i>L. guyanensis</i> ao Sb ^{III} ou à pentamidina	33
7.2 Padronização da infecção de células da linhagem THP-1 por isolados de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	40
7.3 Avaliação do grau de susceptibilidade <i>in vitro</i> de formas amastigotas ao antimonial pentavalente e à pentamidina com macrófagos peritoneais murinos	42
8. DISCUSSÃO	42
9. CONCLUSÃO	48
10. PERSPECTIVAS	49
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
12. ANEXOS	55

ANEXO A – Aprovações do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático do ciclo de desenvolvimento e transmissão de parasitos do gênero <i>Leishmania</i> spp.	16
Figura 2: Padrão de distribuição da endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo	18
Figura 3: Leishmaniose cutânea e mucosa em países endêmicos das Américas.	19
Figura 4: Incidência e densidade de casos de leishmaniose cutânea e mucosa em 2014.	20
Figura 5: Nível de susceptibilidade dos isolados de <i>Leishmania</i> ao antimonial trivalente	35
Figura 6: Nível de susceptibilidade dos isolados de <i>Leishmania</i> à pentamidina.	36
Figura 7: Análise do nível de susceptibilidade dos isolados de <i>L. guyanensis</i> ao Sb ^{III}	38
Figura 8: Análise do nível de susceptibilidade dos isolados de <i>L. guyanensis</i> à pentamidina	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema terapêutico de tratamento preconizado para as diversas formas clínicas de LTA, segundo Ministério da Saúde.	21
Tabela 2: Dados dos pacientes com leishmaniose cutânea cujos isolados de <i>Leishmania</i> foram obtidos antes do tratamento.	27
Tabela 3: Dados sobre o tratamento inicial, resposta ao tratamento e valores de IC ₅₀ (µM) com erro padrão obtidos para formas promastigotas dos isolados de <i>L. guyanensis</i> avaliados no tempo de 72 horas de exposição a diferentes concentrações de antimonial trivalente e pentamidina	33
Tabela 4: Valores da taxa e índice de infecção com formas amastigotas por <i>Leishmania guyanensis</i>	40

Lista de Quadros

Quadro 1: Padronização da relação parasito/macrófago nos ensaios de infecção por *Leishmania guyanensis*.

39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Do inglês, trifosfato de adenosina
CEP	Comite de ética em pesquisas
CLIOC	Coleção de <i>Leishmania</i> do Instituto Oswaldo Cruz
DNA	Do inglês, Ácido desoxirribonucleico
FMT	Fundação de Medicina Tropical
GTP	Do inglês, trifosfato de guanosina
IC₅₀	Do inglês, concentração inibitória de 50%
IMT	Instituto de Medicina Tropical
LC	Leishmaniose cutânea
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MS	Ministério da Saúde
NNN	Meio de Neal, Novy, Nicolle
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
Sb^{III}	Antimonial trivalente
Sb^V	Antimonial pentavalente

1. Introdução

A leishmaniose tegumentar é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Os protozoários do gênero *Leishmania* pertencem à família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida. O parasito é encontrado no trato digestivo do hospedeiro invertebrado sob a forma promastigota com flagelo aparente. Outra forma evolutiva observada no interior de células do sistema fagocítico mononuclear de hospedeiros vertebrados, apresentam flagelo inaparente, e é denominada amastigota. *Leishmania* spp é um parasito unicelular e heteroxeno, transmitido para diversos mamíferos como marsupiais, edentados, roedores e ao homem. Quando a fêmea de um flebótomo lacera a pele de um hospedeiro vertebrado infectado, aspira sangue contendo macrófagos parasitados ou amastigotas livres. Essas amastigotas são liberadas no interior do tubo digestivo do inseto e no epitélio intestinal se diferenciam em formas flageladas chamadas promastigotas procíclicas. Essas, por sua vez, se dividem sofrendo um processo de metaciclogênese e transformando-se em formas promastigotas metacíclicas. Essas formas infectivas do parasito se destacam do epitélio intestinal, migrando para o proventrículo do inseto e durante o próximo repasto, essas formas são transmitidas ao hospedeiro vertebrado (Figura 1). Dentro dos fagolissomos de macrófagos residentes, promastigotas se transformam em amastigotas (esféricas e sem flagelo aparente) e se replicam, podendo infectar outras células, espalhando-se pelos diversos tecidos do organismo (Stockdale & Newton 2013).

Existem cerca de 20 espécies de *Leishmania* e aproximadamente 30 espécies de flebotomíneos identificados como vetores da leishmaniose, onde no continente Americano, o gênero *Lutzomyia* é predominante. Estes vetores pertencem aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Stockdale & Newton 2013).

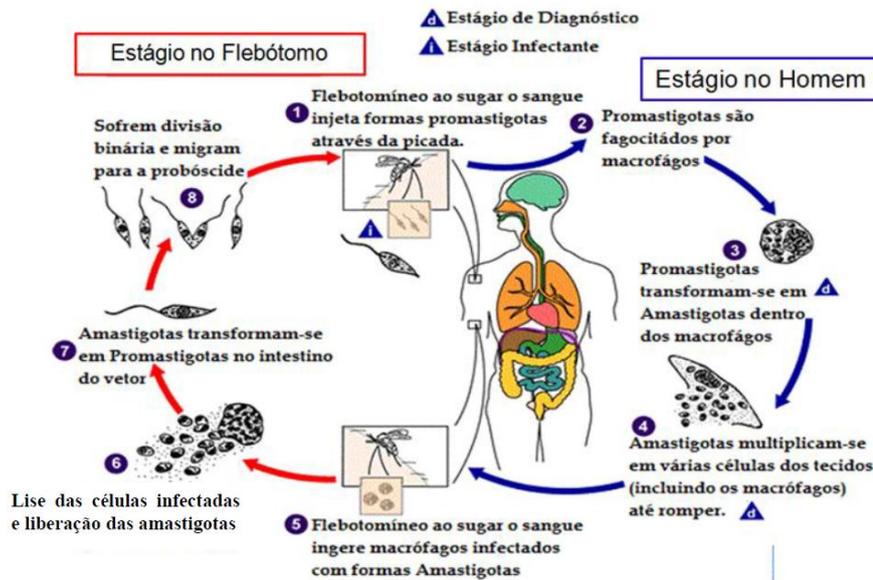


Figura 1: – Desenho esquemático do ciclo de desenvolvimento e transmissão de parasitos do gênero *Leishmania* spp.

Fonte: Adaptado: cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html. 2017.

1.1 Leishmaniose tegumentar Americana

A LTA é uma doença dermatológica, caracterizada por diferentes manifestações clínicas, constituindo um grave problema de saúde pública. As úlceras cutâneas podem ser causadas por qualquer uma das espécies dermatrópicas de *Leishmania*. A variedade de manifestações clínico-patológicas da doença é atribuída a uma complexa interação de fatores ligados a espécies do parasito, resposta imunológica do paciente e, conseqüentemente, fatores resultantes da interação parasito-hospedeiro (Arevalo et al. 2007).

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

As principais manifestações clínicas das leishmanioses decorrentes da infecção por espécies dermatrópicas do parasito podem ser:

1.1.1 - Forma cutânea localizada:

É o tipo de apresentação clínica mais comum da LTA. A úlcera cutânea típica é indolor, arredondada ou ovoide, de tamanho variável, com bordas bem delimitadas, elevadas e eritematosas, fundo granuloso e que sangra facilmente. Havendo infecção bacteriana associada, um exsudato amarelado pode estar presente. Também são descritas formas não ulcerosas que podem se apresentar com aspecto nodular, verrugoso ou liquenóide (Da-Cruz & Pirmez, 2015). As lesões se localizam preferencialmente em áreas descobertas, como membros superiores e inferiores. Entretanto, a localização em áreas pouco relatadas como a região genital e rebordo ungueal, pode trazer dificuldade no diagnóstico em função da apresentação dermatológica pouco comum (Oliveira-Neto, 1998).

O comprometimento dos gânglios linfáticos é frequente, podendo preceder as lesões cutâneas (Barral et al. 1995). Ao regredirem, as úlceras deixam cicatrizes com dimensões que se mantêm nos limites da úlcera, em geral lisas, brilhantes, finas e sedosas, com áreas de hiper ou de hipopigmentação, podendo assumir a coloração natural da pele (Schubach et al., 1998a; Oliveira-Neto et al., 2000). A ocorrência de traumatismo da cicatriz pode levar à reativação da doença (Oliveira-Neto et al., 1998), provavelmente relacionada à manutenção de parasitas no local (Schubach et al., 1998b). Outras formas clínicas da leishmaniose cutânea também podem ser observadas como: cutânea disseminada com lesões múltiplas, e mucocutânea com lesão cutânea e mucosa ativas simultaneamente (Brasil, 2013).

1.1.2 - Forma mucosa

Neste caso, as lesões localizam-se nas mucosas. Normalmente são lesões secundárias à forma cutânea. Admite-se que cerca de 3 a 5% dos casos de LC, causados por *L. braziliensis* desenvolvam a forma mucosa (Oliveira-Neto, 1998). *Leishmania braziliensis* é a principal espécie associada aos casos de lesão mucosa, embora outras espécies como *L. amazonensis* e *L. guyanensis* já tenham sido isoladas desta forma clínica (Grimaldi & Tesh, 1993; Guerra et al. 2011). O intervalo de tempo entre a infecção inicial e o início das infecções mucosas é bastante variável. Porém, admite-se que, em mais da metade dos casos, esta evolução ocorra dentro de um período médio de seis anos (Jones et al., 1987). As mucosas podem apresentar-se infiltradas e eritematosas. A evolução das lesões pode levar à destruição do septo nasal e ao acometimento do assoalho das fossas nasais, da orofaringe, da laringe e da traquéia, além da pele que recobre o nariz e a região supra labial. Outras regiões acometidas mais raramente são a conjuntiva ocular e a genitália (Oliveira-Neto, 1998).

1.1.3 Forma difusa

É uma manifestação grave, causada por *L. amazonensis* com lesões nodulares e múltiplas, com formação de placas infiltradas em áreas expostas como face, membros superiores e inferiores. Essas lesões, em geral, não apresentam ulceração e a doença tende a evitar as mucosas (Silva., 1978). Quando a invasão da semimucosa ou mucosa é verificada, se dá por contiguidade com as lesões cutâneas (Costa et al., 2005). Embora ocorra em diversos estados brasileiros a prevalência da forma cutânea difusa é rara. O tratamento é difícil ou ineficaz (Brasil, 2013).

2. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar Americana

As leishmanioses estão presentes em 98 países nos cinco continentes, com uma taxa de incidência anual de mais de 58.000 casos de leishmaniose visceral e uma estimativa de incidência anual de 0,7 a 1,2 milhões de casos da leishmaniose tegumentar (Alvar et al. 2012). Mais recentemente a Organização Mundial da Saúde (OMS) fez um levantamento da distribuição da leishmaniose cutânea em 102 países, áreas ou territórios em todo o mundo. A partir dos dados disponíveis, a OMS estimou que 70% dos de casos de leishmaniose cutânea ocorrem em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, República Islâmica do Irão, Peru, Sudão e República Árabe Síria, onde o Brasil tem uma incidência da doença de 1,46 casos em 10.000 habitantes (WHO 2016).

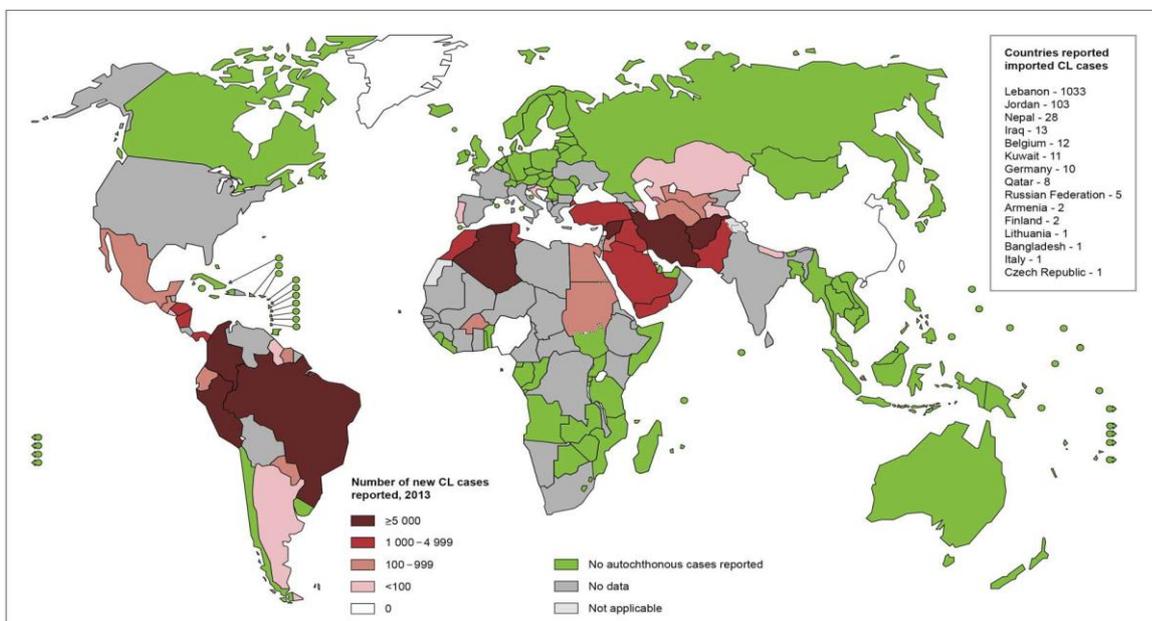


Figura 2: Padrão de distribuição da endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo (2015). Fonte: WHO, 2016.

No período de 2001 a 2014, foi relatado a Organização Panamericana de Saúde/OMS um total de 797.849 casos novos de leishmaniose cutânea e mucosa com média anual de 56.989 casos distribuídos em 17 dos 18 países endêmicos das Américas. Em 2014, um total de 16 países endêmicos relataram 51.098 casos de leishmanioses cutânea/mucosa com uma taxa de incidência de 19,76 casos por 100.000 habitantes. Neste mesmo ano um total de 75% dos casos detectados foi relatado no Brasil (20.418), Colômbia (11.586) e Peru (6.231). No entanto, as maiores incidências foram registradas na Nicarágua (62,97/100.000 habitantes) e Costa Rica (52,55/100.000 habitantes), países da região Centro América. A figura 3 mostra os casos de leishmaniose cutânea e mucosa em países endêmicos nas Américas. O eixo x mostra o período correspondente aos anos de 2001 a 2014 e o eixo y o número de casos (PAHO 2016).

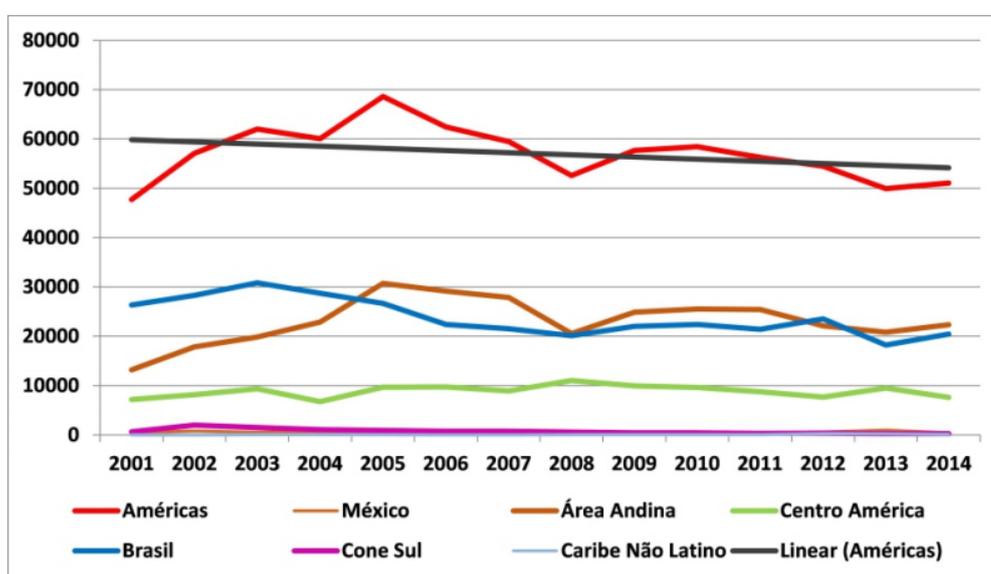


Figura 3: Leishmaniose cutânea e mucosa em países endêmicos das Américas, 2001-2014.

Fonte: SisLeish-OPAS/OMS, 2016.

No Brasil, no início da década de 1980 foram registrados casos autóctones de LTA em 19 Unidades Federadas e, no ano de 2003, foi confirmada autoctonia em todos os estados brasileiros. A região Norte vem contribuindo com o maior número de casos (cerca de 37,3% do total de casos registrados) e com os coeficientes médios mais elevados (73,3 casos/ 100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-oeste (35,4 casos/100.000 habitantes) e Nordeste (18,8 casos/100.000 habitantes) (Brasil 2014).

O registro do número de casos de LTA no Brasil demonstra que os coeficientes mais elevados ocorreram nos anos de 1994 (22,83 casos/100.000 habitantes) e 1995 (22,94 casos/100.000 habitantes). Já no período de 2001 a 2014, a LTA apresentou média anual de 20.418 novos casos registrados e coeficiente de detecção médio de

16,71 casos/100.000 habitantes. Além do elevado número de casos, os dados mostram a ampla distribuição geográfica da leishmaniose cutânea nas Américas. O mapa da figura 4 caracteriza a nível regional os locais de acordo com o risco de transmissão, sendo diferenciados pela intensidade das cores. Como pode ser observada, a região norte apresenta os maiores índices de transmissão do Brasil (PAHO 2016).

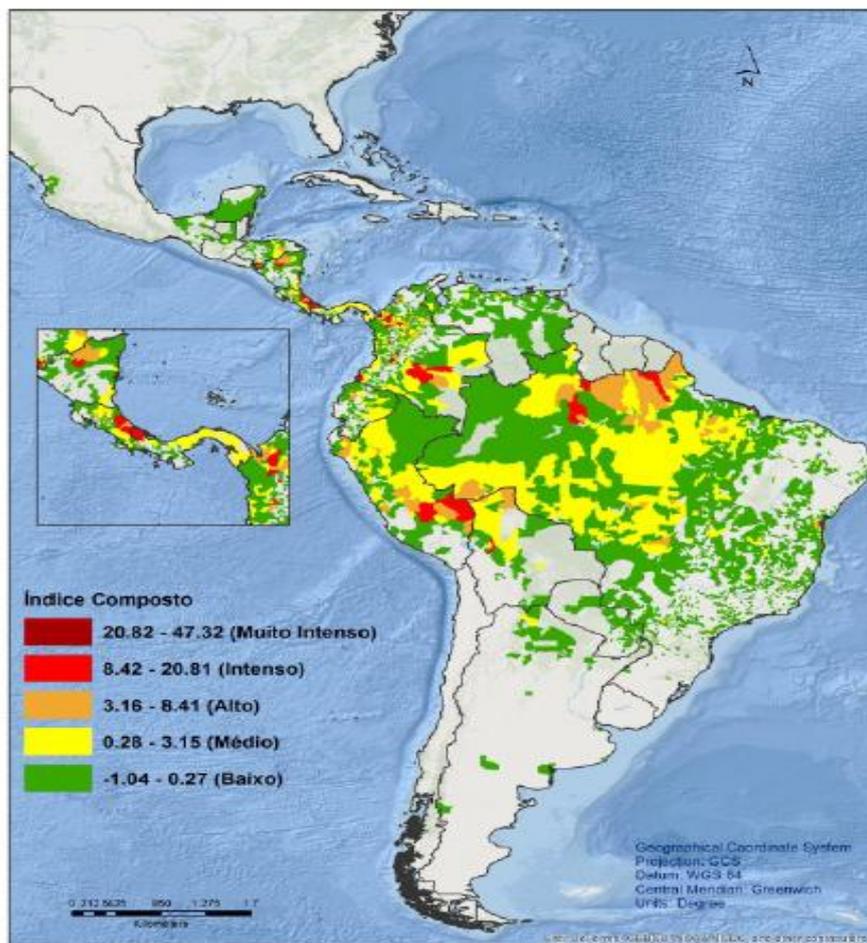


Figura 4: Incidência e densidade de casos de leishmaniose cutânea e mucosa em 2014.
Fonte: SisLeish-OPAS/OMS, 2016.

3. Tratamento da Leishmaniose tegumentar Americana.

Em 1912 o médico Gaspar de Oliveira Vianna descreveu que o tártaro emético era eficaz no tratamento da leishmaniose tegumentar Americana. Bramachari, em 1920, desenvolveu o primeiro composto à base de antimônio pentavalente, o uréia estibamina, derivado uréico do ácido p-aminofenilestibínico. Em 1936, Schmidt introduziu na terapia médica o gluconato de antimônio (V) sódico, conhecido comercialmente como Pentostam® (Glaxo Wellcome). Durante a Segunda Guerra Mundial, surgiu na França um medicamento alternativo o até então gluconato de antimônio (V) sódico, o antimoniato de N-metil glucamina, comercializado como

Glucantime® (Rhône-Poulenc-Rohrer) ou antimoniato de meglumina (Rath et al. 2003). Até hoje o medicamento de primeira linha recomendado pela OMS no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (WHO, 2010). Os medicamentos de segunda escolha empregados no tratamento da leishmaniose são a anfotericina B e a pentamidina, os quais são indicados quando se verifica ausência de resposta ao antimonial pentavalente após 2 cursos completos de tratamento (Tabela 1)(Brasil, 2010).

Tabela 1: Esquema terapêutico de tratamento preconizado para as diversas formas clínicas de LTA, segundo Ministério da Saúde.

Forma clínica	1ª escolha	Alternativas		
		Desoxicolato de anfotericina B. 1mg/kg/dia diariamente ou em dias alternados (dose máxima diária de 50mg) Deve ser administrada até atingir as seguintes doses totais:	Anfotericina B Lipossomal	Pentamidina
Cutânea localizada	15mg/kg/dia (10 - 20mg Sb ^V /kg/dia)	1 a 1,5g	1 a 4mg/kg/dia	4mg/kg/dia, em dias alternados
Cutânea difusa	20mg/Sb Sb ^V /kg/dia	1 a 1,5g	1 a 4mg/kg/dia	4mg/kg/dia, em dias alternados
Mucosa	20mg/Sb Sb ^V /kg/dia	2,5 a 3g	1 a 4mg/kg/dia	4mg/kg/dia, em dias alternados

Fonte: Adaptado Brasil, 2014.

3.1 Antimoniato de meglumina

Nas formas cutânea localizada e disseminada, a dose recomendada varia entre 10 e 20mgSb^V/kg/dia, sugerindo-se 15mg Sb^V/kg/dia tanto para adultos quanto para crianças durante 20 dias seguidos. Porém se não houver melhora significativa, o esquema pode ser prolongado por mais 10 dias, até que as lesões fiquem fechadas ou cicatrizadas (Brasil. 2013).

O antimonial pentavalente é considerado um pró-fármaco que requer ser convertido em antimonial trivalente cujo mecanismo de ação caracteriza-se pela interferência na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos do parasito, processos localizados em organelas peculiares, são inibidos, sendo que esta inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP (Croft et al. 2006).

Os efeitos adversos mais frequentes são artralgia e mialgia. Porém, alterações mais graves como cardíacas, renais, hematológicas, pancreáticas ou hepáticas podem contribuir para a suspensão do tratamento. Normalmente doses de 20mg Sb^V/kg/dia estão mais associadas aos efeitos adversos. Esquemas alternativos utilizando doses

sistêmicas mais baixas (5mg Sb^V/kg/dia) ou doses por via intralesional têm sido utilizados com sucesso e com o benefício da diminuição significativa de efeitos tóxicos apresentados pelo antimonial (Oliveria-Neto et al. 1997a; Schubach et al. 1998a).

3.2 Anfotericina B

A anfotericina B tem sido usada no tratamento da leishmaniose e, em algumas partes do mundo, é o fármaco de escolha. Também é utilizada quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente ou na impossibilidade de seu uso, por exemplo, em gestantes. Este fármaco atua no ergosterol presente na membrana do parasito. Com o aumento da permeabilidade da membrana celular ocorre um influxo de íons, levando o protozoário à morte (Goto & Lindoso, 2010). A anfotericina B lipossomal é uma nova formulação, na qual o fármaco é incorporado dentro de lipossomas compostos por fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. Isto não apenas reduz a toxicidade do fármaco, como também aumenta a eficiência e a concentração nos tecidos (Brasil, 2013).

Seus efeitos adversos são febre, cefaléia, náuseas, vômitos, tremores, calafrios, flebite no local da infusão e dor lombar.

3.3 Pentamidina

A pentamidina vem sendo utilizada como fármaco de segunda escolha no tratamento da leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas dos continentes Americano, Asiático e Africano. Este fármaco interfere com a síntese de DNA de *Leishmania*, modificando a morfologia do cinetoplasto e promovendo a fragmentação da membrana mitocondrial, matando o parasita. As reações adversas mais frequentes são: dor, induração e abscessos estéreis no local da aplicação, além de náusea, vômito, tontura, mialgia, cefaléia, hipotensão, lipotimia, hipoglicemia e hiperglicemia (Goto & Lindoso 2010; Brasil 2013).

4. Critérios de cura e falha terapêutica na leishmaniose tegumentar Americana

O critério de cura é clínico sendo indicado o acompanhamento regular por 12 meses. Ele é definido pela epitelização das lesões ulceradas, regressão total da infiltração e do eritema, até três meses após a conclusão do esquema terapêutico. Já a falha terapêutica é definida como aquele caso que recebeu dois esquemas terapêuticos regulares sem apresentar remissão clínica (Brasil, 2013). A falha no tratamento das leishmanioses constitui um problema em diversas áreas endêmicas (Croft et al. 2006). Segundo o manual do MS, o paciente deve retornar mensalmente à consulta durante três meses consecutivos após o término do esquema terapêutico para ser avaliada a cura clínica.

Na América Latina, o tratamento com Sb^V nem sempre resulta na cura clínica. Nos últimos anos, foram realizados poucos ensaios clínicos para avaliar a eficácia de fármacos para tratamento da LTA, com o cuidado de identificar a espécie do parasito responsável pelos casos (Neves et al. 2011a). O ensaio clínico realizado por Romero e colaboradores (2001), demonstrou que os índices de cura para o antimonial pentavalente eram de 26,3% dos casos por *L. guyanensis*. Outro ensaio clínico envolvendo 198 pacientes com leishmaniose cutânea realizado na Guiana Francesa demonstrou taxas de cura de 87% quando os pacientes eram tratados com isotionato de pentamidina para a espécie *L. guyanensis* (Nacher et al. 2001). Mais recentemente em 2011, foi realizada a comparação entre antimonial pentavalente e miltefosina em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. guyanensis*, sendo os índices de cura de 53,3% e 70,7%, respectivamente (Chrusciak-Talhari et al. 2011). Os mecanismos subjacentes a esse elevado percentual de falha terapêutica não estão esclarecidos, mas podem estar relacionados a características biológicas das diferentes espécies do parasito ou à resposta imune induzida por antígenos de *Leishmania* no hospedeiro (Da-Cruz & Pirmez 2005).

Dessa forma, o presente trabalho foi motivado por vários aspectos como: o fato da região Norte deter as maiores incidências de LTA do país; o tratamento com o fármaco de primeira escolha recomendado pelo manual do Ministério da Saúde resultar em significativas taxas de falha terapêutica, o que difere do restante do país; a espécie responsável pela maioria dos casos de LTA na região de Manaus ser *L. guyanensis*; e pequena quantidade de trabalhos que investigaram tal espécie no Brasil terem sido realizados.

Nossa hipótese é que os casos de falha terapêutica podem estar associados a menor susceptibilidade do parasito ao antimonial. Testar tal hipótese é de fundamental

importância para ajudar a esclarecer as causas das altas taxas de falha terapêutica e com isso, ajudar a definir novas recomendações de tratamento para LTA na região de Manaus, com intuito de minimizar o sofrimento para os pacientes que não apresentam cura clínica após o tratamento e os custos para o sistema único de saúde.

5. Objetivos

5.1 Objetivo Geral:

Investigar a associação entre o grau de susceptibilidade de isolados de *L. (V.) guyanensis* frente aos fármacos leishmanicidas e o desfecho clínico após tratamento dos pacientes com LTA provenientes de Manaus.

5.2 Objetivos Específicos:

5.2.1. Avaliar o grau de suscetibilidade ao antimônio trivalente e à pentamidina de isolados de *L. (V.) guyanensis* oriundos de pacientes com leishmaniose cutânea provenientes da região Amazônica.

5.2.2. Investigar se há relação entre o grau de suscetibilidade aos fármacos leishmanicidas e a ocorrência de falha terapêutica nos pacientes de leishmaniose cutânea.

6. Material e Métodos

6.1 Considerações éticas

Para a obtenção do fragmento de lesão dos pacientes com LTA foi necessário a aprovação do CEP-FMT/IMT/AM conforme parecer # 560.914, de 28/03/2014 e para o uso de macrófagos de lavado peritoneal de camundongos o CEUA-FIOCRUZ # L-026/2015, de 08/07/2015.

6.2 Casuística

Os isolados são provenientes de pacientes da Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado/Manaus-AM, onde foi realizado o diagnóstico clínico e laboratorial por biópsia cutânea com o auxílio de "punch" nas bordas infiltradas. Posteriormente pela técnica de aposição em lâmina (imprint) do fragmento obtido da biópsia, seguidamente o tratamento, com o acompanhamento clínico por três meses.

Foram selecionados 09 isolados de pacientes foram caracterizados quanto à espécie pela Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC -FIOCRUZ) como *L. (V.) guyanensis*. Estes foram classificados em quatro grupos: a) isolados de pacientes cujo desfecho clínico foi o sucesso terapêutico quando tratado com antimonial pentavalente (ST-Sb^V, n=2); b) desfecho clínico foi a falha terapêutica apesar de tratado com Sb^V (FT-Sb^V, n=4); c) isolado de paciente cujo desfecho clínico foi o sucesso terapêutico quando tratado com pentamidina (ST-Pentamidina, n=1); d) desfecho clínico foi a falha terapêutica apesar de tratado com pentamidina (FT-Pentamidina, n=2). Destes isolados, quatro foram de pacientes mulheres e cinco homens, com idades entre 8 e 68 anos. Quatro pacientes apresentaram mais de duas lesões, enquanto que cinco apresentaram apenas uma lesão. Seis pacientes foram tratados pela primeira vez com antimoniato de meglumina e três foram tratados pela primeira vez com pentamidina.

A falha terapêutica foi observada em quatro pacientes tratados com antimoniato de meglumina e dois com pentamidina. Os dados dos pacientes relacionados à clínica e aos esquemas terapêuticos empregados estão representados na Tabela 2.

6.3 Critérios de inclusão dos isolados dos pacientes.

- ✓ Isolados de pacientes que apresentavam a forma cutânea da LTA;
- ✓ Isolados de pacientes cujas amostras tenham sido identificadas pela técnica de isoenzimas como *L. guyanensis*.
- ✓ Isolados de pacientes que foram submetidos ao tratamento inicial com antimonial pentavalente ou pentamidina.
- ✓ Isolados de pacientes que obtiveram o desfecho clínico no primeiro ciclo de tratamento.

6.4 Obtenção dos isolados de *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

Os parasitos foram isolados a partir de cultivos de fragmentos de lesão obtidos da biópsia cutânea positiva para LC realizada com o auxílio de "punch" nas bordas infiltradas. Foi realizada a técnica de aposição em lâmina (imprint) do fragmento obtido da biópsia para confirmação da presença de *Leishmania*. Posteriormente o fragmento de lesão foi "macerado" e colocado em meio NNN (Neal, Novy, Nicolle) acrescido de RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1% de L-glutamina (RPMI completo). Após isolamento do parasito, a cultura foi expandida e criopreservada. Uma amostra destes isolados foi caracterizada quanto à espécie pela

Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC -FIOCRUZ) através da técnica de isoenzimas e depositada na mesma. Os diferentes isolados foram controlados quanto ao número de passagens *in vitro*, sendo os experimentos realizados até a quinta passagem. Os isolados de *Leishmania* encontram-se armazenados no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMed).

Tabela 2: Dados dos pacientes com leishmaniose cutânea cujos isolados de *Leishmania* foram obtidos antes do tratamento.

Isolado	Sexo	Idade	Forma clínica	Duração da doença	Número de lesões	Localização	Tratamento inicial	Resposta ao tratamento	Tratamento secundário
001/16	Masc	29	LC	Dado não informado	1	MSD	G	Cura clínica	-----
002/16	Masc	17	LC	30 dias	1	Pescoço	G	Falha terapêutica	G / P
003/16	Masc	68	LC	Dado não informado	4	MSD, dorso, MMII, linfadenite	G	Falha terapêutica	G
004/16	Fem	15	LC	75 Dias	1	MID	G	Cura clínica	-----
005/16	Fem	60	LC	30 Dias	3	MMSS	G	Falha terapêutica	P
006/16	Masc	34	LC	30dias	1	MS	G	Falha terapêutica	G / P
007/16	Masc	N/I	LC	60 Dias	1	MSD	P	Cura clínica	-----
008/18	Fem	58	LC	Dado nao informado	>20	Pápulas dispersas pelo corpo	P	Falha terapêutica	Anfo B
009/16	Fem	8	LC	30	10	Cabeça, MS, MI	P	Falha terapêutica	P / G / Anfo B / G

G (Glucantime®); Anfo B (Anfotericina B); P (Pentamidina); Fem (feminino); Masc (masculino); MSD (membro superior direito); MMII (membros inferiores); MMSS (membros superiores); MID (membro inferior direito).

6.5 Delineamento do estudo

A susceptibilidade de formas amastigotas intracelulares aos fármacos leishmanicidas (antimônio e pentamidina) foi avaliada a partir de macrófagos infectados *in vitro* e tratados com diferentes concentrações dos fármacos. Assim, seria definida a concentração dos fármacos capazes de inibir em 50% (IC₅₀) os macrófagos infectados (taxa de infecção) e as médias de amastigotas por macrófagos (índice de infecção), quando comparados com o controle não tratado. Entretanto por limitações técnicas não foi possível definir a IC₅₀ a partir de amastigotas intracelulares.

Já a susceptibilidade de formas promastigotas aos fármacos leishmanicidas foi avaliada *in vitro* através da quantificação do crescimento do parasito sob o efeito de diferentes concentrações de antimonial trivalente ou pentamidina. Assim, foi definida a concentração de fármaco capaz de inibir em 50% (IC₅₀) o crescimento de formas promastigotas. Para tal, uma cultura controle sem adição de fármaco foi realizada em paralelo. Em seguida foi analisada a relação entre a IC₅₀ e o desfecho clínico apresentado pelo paciente após tratamento.

6.6 Ensaio para avaliação *in vitro* da susceptibilidade de formas promastigotas ao antimonial trivalente e à pentamidina.

Formas promastigotas de *L. (V.) guyanensis* foram cultivadas em meio Schneider acrescido de L-glutamina (1mM/ml), antibiótico (penicilina: 200ug/mL; estreptomicina: 200ug/mL), soro fetal bovino (20%) (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) em temperatura de 26-28°C. O inóculo inicial foi de 5x10⁵ promastigotas por mililitro, e as contagens por microscopia óptica em câmara de Neubauer realizadas com intervalos de 24 horas durante sete dias até atingirem a fase estacionária.

Para avaliar a sensibilidade das formas promastigotas aos diferentes fármacos, as mesmas foram cultivadas na presença das seguintes concentrações: antimonial trivalente (Sb^{III}) (0µM, 3,12µM, 6,25µM, 12,5µM, 25µM, 50µM, 100µM e 200µM) e pentamidina (0µM, 0,09µM, 0,18µM, 0,37µM, 0,75µM, 1,5µM, 3µM e 6µM). Utilizou-se antimonial trivalente e a pentamidina ambos da SigmaChemicalCo, St. Louis, EUA. O antimonial trivalente foi diluído em meio de cultura Schneider e estocado a temperatura ambiente, sendo empregado em todos os ensaios o mesmo lote. A pentamidina foi diluída em água deionizada (tipo II) e estocada a - 20°C.

Os ensaios foram realizados três vezes em triplicata em placas para cultura de 96 poços com fundo chato e avaliados após 72 horas de exposição ao antimônio trivalente e a pentamidina. As amostras foram avaliadas em pares na mesma placa e no mesmo momento. Um volume de 100 µL da suspensão contendo 1×10^6 parasitas/ml, foi adicionado em triplicata aos poços da placa. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume de meio contendo as diferentes concentrações do fármaco (100µL). Para as preparações das diferentes concentrações dos fármacos foram empregadas diluições seriadas (fator de diluição 2 vezes), de antimônio trivalente e pentamidina, iniciando na concentração de 200µM até 3,12µM de Sb^{III} e 6µM até 0,09µM de pentamidina, conforme apresentado acima. As placas foram incubadas em estufa entre 26-28°C, por 72 horas. Após esse período o crescimento parasitário foi avaliado por ensaio colorimétrico com emprego da resazurina (Alamar Blue®) que é um indicador de oxi-redução não tóxica para as formas promastigotas que é reduzida, e que muda sua cor azul para vermelho em promastigotas viáveis (Fumarola et al. 2004). Foram adicionados 22µL de resazurina (3mM) por poço e a placa foi incubada a 26-28°C por um período de 1 a 4 horas. Após esse período, a reação foi analisada no espectrofotômetro com filtros de comprimento de onda entre 560nm a 590 nm.

6.7 Ensaios para avaliação *in vitro* da susceptibilidade de formas amastigotas ao antimônio pentavalente e à pentamidina com linhagem celular THP-1.

6.7.1 Avaliação por microscopia óptica para determinar a taxa e índice de infecção dos isolados de *Leishmania guyanensis*.

A linhagem celular (THP-1) foi estabelecida por Tsuchiya e colaboradores (1980). Esta linhagem é amplamente usada como um modelo bem estabelecido para estudos toxicológicos, imunológicos e “screening” para fármacos leishmanicidas (Gebre-Hiwot et al., 1992). Para a realização deste ensaio, foi utilizada a linhagem celular THP-1 onde a mesma foi mantida em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1% de L-glutamina (RPMI completo) por 72 horas, 37°C, e atmosfera com 5% CO_2 . Após este período as células foram centrifugadas a 500 x g por 15 minutos numa temperatura de 4°C e ressuspendidas em 1mL de meio RPMI. Após a contagem, as células foram ajustadas e transferidas para placas de cultura de 24 poços, contendo lamínula estéril, de forma que a concentração final fosse de 5×10^5 células/poço. Estas foram diferenciadas em macrófagos quando incubadas com 30nM de phorbol 12-miristato 13-acetato (PMA)

(Sigma-Aldrich Brasil Ltda) durante 72 horas. As células não aderentes foram retiradas após lavagem com meio de cultura e novamente incubadas com meio de cultura durante 72 horas nas condições especificadas acima.

Em seguida foi realizada uma padronização da proporção da infecção (3:1; 5:1; 7:1 e 10:1) de parasito em relação ao macrófago THP-1 (5×10^5) para definir a melhor relação de infecção. Baseado nessa proporção foi estabelecido que a infecção destas células pela adição de formas promastigotas em fase estacionária obedeceria a uma relação parasito/macrófago de 10:1. A placa foi incubada durante 24 horas, em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, para que ocorresse a infecção dos macrófagos. Após este período foram realizadas três lavagens com meio RPMI completo, a 37°C, para remover promastigotas não fagocitadas. Os diferentes poços foram tratados com o antimonial pentavalente (Glucantime ®) (100µg; 50µg; 25µg; 12,5µg; 6,25µg; 0µg) ou Pentamidina (6µg; 3µg; 1,5µg; 0,75µg; 0,375µg; 0µg) e incubadas por 72 horas. Após este período as lamínulas foram fixadas e coradas pelo panótico (Laborclin). Em seguida foram seladas às lâminas com o Entellan e posteriormente analisadas por microscopia óptica. Foi contado um total de 100 macrófagos por lamínula avaliando o número de macrófagos infectados (taxa de infecção) e o número médio de amastigotas por macrófagos (média de amastigotas). Conforme fórmulas abaixo:

$$\text{Taxa de infecção} = \frac{\text{Número de macrófagos infectados}}{\text{Número total de macrófagos}} \times 100$$

$$\text{Média de amastigotas} = \frac{\text{Número de amastigotas intracelulares}}{\text{Número macrófagos infectados}}$$

6.8 Ensaio para avaliação *in vitro* da susceptibilidade de formas amastigotas ao antimonial pentavalente e à pentamidina com macrófagos peritoneais murinos.

6.8.1 Coleta e plaqueamento dos macrófagos murinos.

Os macrófagos foram obtidos por lavagens da cavidade peritoneal de camundongos adultos BALB/c com meio RPMI-1640 (GIBCO®) conforme descrito (Miguel et al. 2008). Após a eutanásia em câmara de CO₂, os camundongos foram imobilizados, em decúbito dorsal, para a assepsia da região abdominal com álcool etílico 70%. Com o auxílio de duas pinças do tipo “dente de rato”, a pele do animal foi cortada e o peritônio exposto. Cerca de 8mL de meio de cultura RPMI foram introduzidos na cavidade peritoneal, utilizando seringa e agulha estéreis. Após suave massagem nessa região, o meio introduzido foi aspirado com a mesma seringa, sendo imediatamente acondicionado em gelo. O volume final foi quantificado e a concentração ajustada para 2×10^6 macrófagos/mL. Para a quantificação foi empregado o corante vital azul de Trypan na concentração de 0,1% em PBS, visando excluir células mortas. Após a contagem, as células foram ajustadas e transferidas para placas de cultura de 24 poços, contendo lamínula estéril. Após 1 hora, os poços foram lavados com solução de RPMI para retirar as células não aderidas.

6.8.2 Infecção dos macrófagos

Em seguida foi realizada a infecção pela adição de formas promastigotas em fase estacionária obedecendo a uma relação parasito/macrófago de 10:1. A placa foi incubada durante 24 horas, em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, para que houvesse a infecção dos macrófagos. Após este período foram realizadas três lavagens com meio RPMI completo, a 37°C, para remover promastigotas não fagocitadas. Os diferentes poços foram tratados com o antimonial pentavalente (Glucantime®) (100µg; 50µg; 25µg; 12,5µg; 6,25µg; 0µg) e pentamidina (6µg; 3µg; 1,5µg; 0,75µg; 0,375µg; 0µg) e incubadas por 72 horas. Após este período as lamínulas foram fixadas com metanol por 3 minutos e posteriormente coradas pelo panótico (Laborclin). Em seguida as mesmas foram seladas com Entellan® (Sigma ChemicalCo, St. Louis, EUA) e posteriormente analisadas por microscopia óptica. Foi contado um total de 100 macrófagos por lamínula avaliando o número de macrófagos infectados (taxa de infecção) e o número de amastigotas por macrófagos (índice de infecção).

6.9 Análise estatística

Os valores de IC₅₀ (concentração da droga capaz de inibir o crescimento dos parasitos em 50%) para antimonial trivalente (Sb^{III}) e pentamidina foram calculados por meio de regressão não linear calculada pelo software GraphPadPrism 5.0, utilizando-se a equação sigmoidal dose-resposta, cuja fórmula é: $Y = \text{Mínimo} + \frac{(\text{Máximo} - \text{Mínimo})}{1 + 10^{\text{Log IC}_{50} - X}}$. Sendo, Y=Resposta; X= Log da concentração das concentrações de Sb^{III} e pentamidina; Máximo= Efeito máximo (% máximo de inibição e Mínimo= Efeito mínimo (% mínimo de inibição, aqui igual ao controle com 0% de inibição).

Todos os dados obtidos em cada experimento foram comparados utilizando-se o teste ANOVA. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$.

7. Resultados

7.1 Análise da sensibilidade *in vitro* dos isolados de *Leishmania guyanensis* ao Sb^{III} ou à pentamidina.

Para a avaliação da sensibilidade *in vitro* dos isolados de *L. guyanensis* formas promastigotas foram cultivadas conforme descrito no item 6.6 onde todos os isolados atingiram a fase estacionária no 4º dia ao final de 7 dias de contagem. O grau de sensibilidade dos isolados de *L. guyanensis* ao antimonial trivalente (Sb^{III}) ou à pentamidina foram expressas pelo valor de IC₅₀, indicando a concentração de Sb^{III} ou de pentamidina necessários para inibir em 50% o crescimento de formas promastigotas durante 72 horas cultivo. O IC₅₀ variou de 6,98 a 61,31µM quando os isolados foram tratados com Sb^{III}, e de 0,09 a 0,89µM quando os isolados foram expostos à pentamidina (Tabela 3). Vale destacar que uma mesma concentração de fármaco utilizada para tratar diferentes isolados de *L. guyanensis* não consegue ter a mesma eficácia em termos de capacidade leishmanicida.

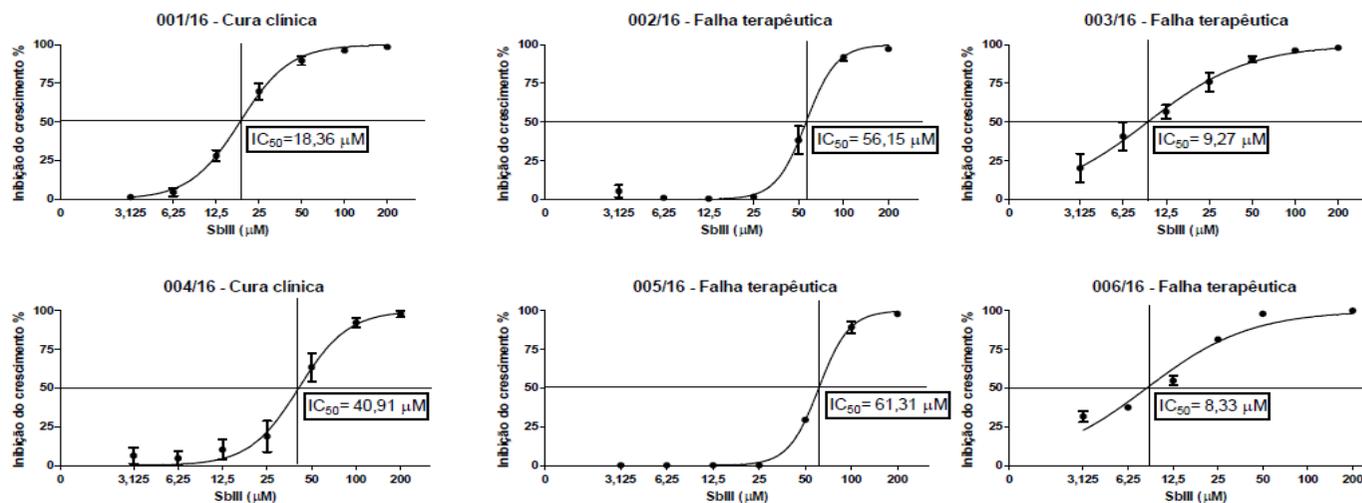
Tabela 3: Dados sobre o tratamento inicial, resposta ao tratamento e valores de IC₅₀ (µM) com erro padrão obtidos para formas promastigotas dos isolados de *L. guyanensis* avaliados no tempo de 72 horas de exposição a diferentes concentrações de antimonia trivalente e pentamidina.

Isolados	Tratamento inicial	Resposta ao tratamento	Sb ^{III} IC ₅₀ (µM) 72 horas	Pentamidina IC ₅₀ (µM) 72 horas
001/16	Sb ^V	Cura clínica	18,36 ^A ± 1,03 ^B	0,89 ± 1,08
002/16	Sb ^V	Falha terapêutica	56,15 ± 1	0,54 ± 1,07
003/16	Sb ^V	Falha terapêutica	9,27 ± 1,1	0,21 ± 1,13
004/16	Sb ^V	Cura clínica	40,91 ± 1,07	0,12 ± 1,09
005/16	Sb ^V	Falha terapêutica	61,31 ± 1,01	0,15 ± 1,05
006/16	Sb ^V	Falha terapêutica	8,33 ± 1,09	0,09 ± 1,05
007/16	Pentamidina	Cura clínica	19,79 ± 1,05	0,12 ± 1,04
008/16	Pentamidina	Falha terapêutica	6,98 ± 1,14	0,09 ± 1,06
009/16	Pentamidina	Falha terapêutica	9,59 ± 1,11	0,15 ± 1,03

^AMedia do valor do IC₅₀; ^Berro-padrão; Sb^V- Antimonial pentavalente; Sb^{III}- Antimonial trivalente; IC₅₀ – Concentração inibitória 50%.

Na figura 5 e 6 são apresentados os gráficos relacionados à curva do percentual de inibição para cada isolado quando tratados com Sb^{III} ou pentamidina, respectivamente. O IC₅₀ é indicado através do ponto da curva que indica a concentração de Sb^{III} (eixo X) que faz interseção com o valor de 50% de inibição de crescimento (eixo Y). De forma geral pode-se observar que para cada concentração dos fármacos, as repetições do teste de sensibilidade dos isolados aos fármacos, resultaram em uma baixa variação das taxas de inibição de crescimento.

Isolados de pacientes que foram tratados com antimônio pentavalente



Isolados de pacientes que foram tratados com pentamidina

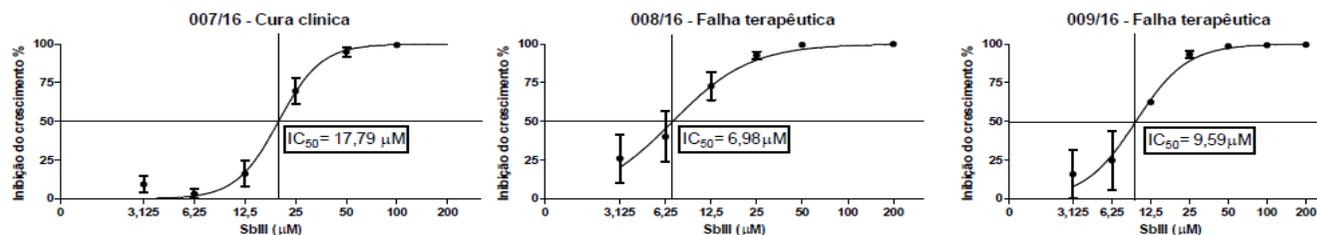
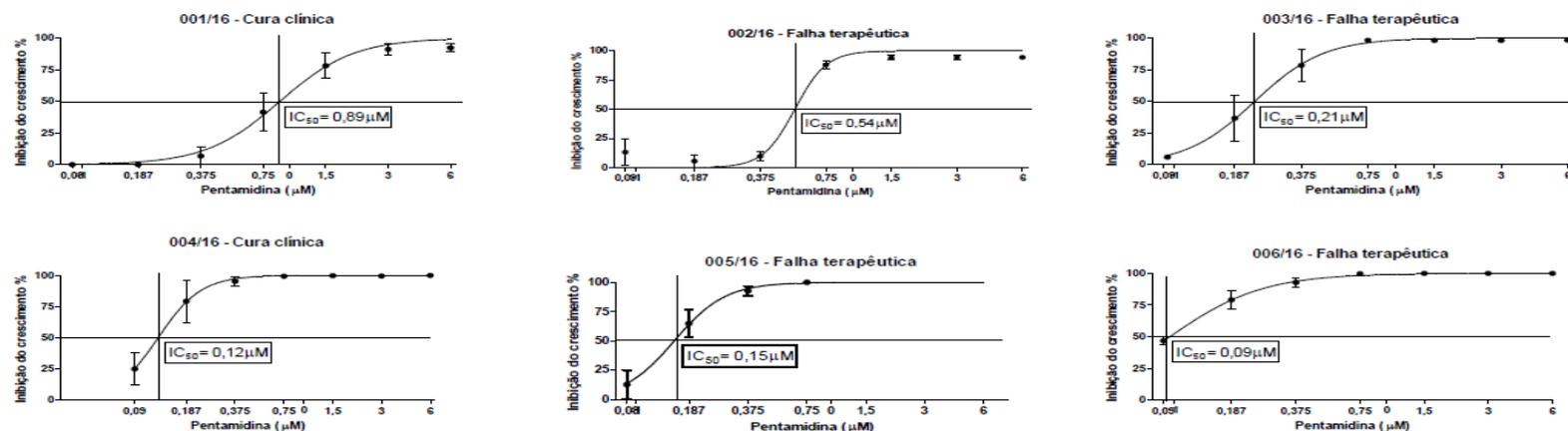


Figura 5: Nível de susceptibilidade dos isolados de *Leishmania guyanensis* ao antimônio trivalente. Formas promastigotas foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de antimônio trivalente (Sb^{III}) durante 72 horas à temperatura de $26^{\circ}C$. Cada ponto do gráfico indica a taxa de inibição do crescimento em função de uma concentração do fármaco. As barras em cada ponto representam o erro padrão referentes aos valores em triplicatas de três experimentos independentes. O valor de IC_{50} (Concentração do fármaco necessário para inibição do crescimento do protozoário em 50%) está indicado na caixa de texto.

Isolados de pacientes que foram tratados com antimonial pentavalente



Isolados de pacientes que foram tratados com pentamidina

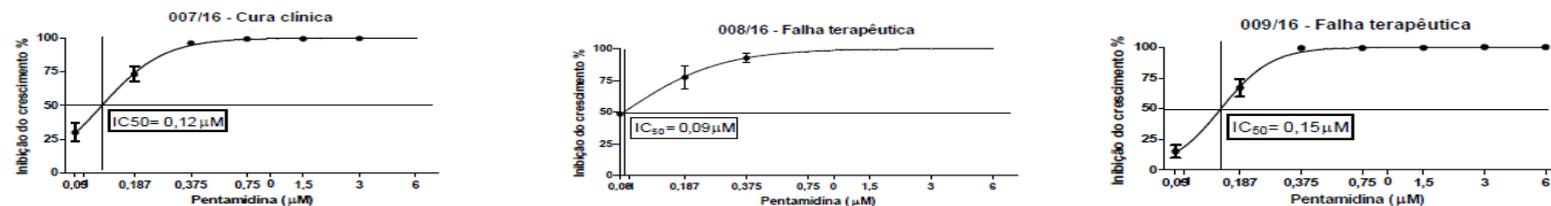


Figura 6: Nível de susceptibilidade dos isolados de *Leishmania guyanensis* à pentamidina. Formas promastigotas foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de pentamidina durante 72 horas à temperatura de 26°C. Cada ponto do gráfico indica a taxa de inibição do crescimento em função de uma concentração do fármaco. As barras em cada ponto representam o erro padrão referentes aos valores em triplicatas de três experimentos independentes. O valor de IC₅₀ (Concentração do fármaco necessário para inibição do crescimento do protozoário em 50%) está indicado na caixa de texto.

Foi observado que dentre os isolados de *L. guyanensis* provenientes de pacientes tratados com Sb^V e que evoluíram clinicamente com falha terapêutica, dois (002/16 e 005/16) de um total de quatro isolados, necessitou de uma concentração do fármaco antimonial trivalente (Sb^{III}) 1,8 a 2,6 vezes maior que a de isolados provenientes de pacientes que evoluíram com cura clínica (001/16 e 004/16) ($p < 0,05$), para inibir 50% do crescimento de formas promastigotas *in vitro* (IC₅₀). Esses dados sugerem que os isolados 002/16 e 005/16 são menos sensíveis ao antimonial. Por outro lado, os outros dois isolados de *L. guyanensis* associados à falha terapêutica (003/16 e 006/16) necessitaram de concentrações de Sb^{III} menores, porém sem significância estatística em relação ao observado nos isolados associados à cura clínica, sugerindo uma maior sensibilidade ao antimonial. Mesmo apresentando maior susceptibilidade ao Sb^{III}, os isolados 003/16 e 006/16 tiveram falha terapêutica ao tratamento inicial com Sb^V (Figura 7).

Dentre os pacientes tratados com pentamidina, os isolados de *L. guyanensis* associados à falha terapêutica dos pacientes (008/16 e 009/16) apresentaram a necessidade de uma concentração do fármaco Sb^{III} 3 a 4 vezes menor do que a observada para o isolado associado à cura clínica (007/16) ($p < 0,05$) (Figura 7).

Sensibilidade *in vitro* de isolados de *L. guyanensis* ao Sb^{III}

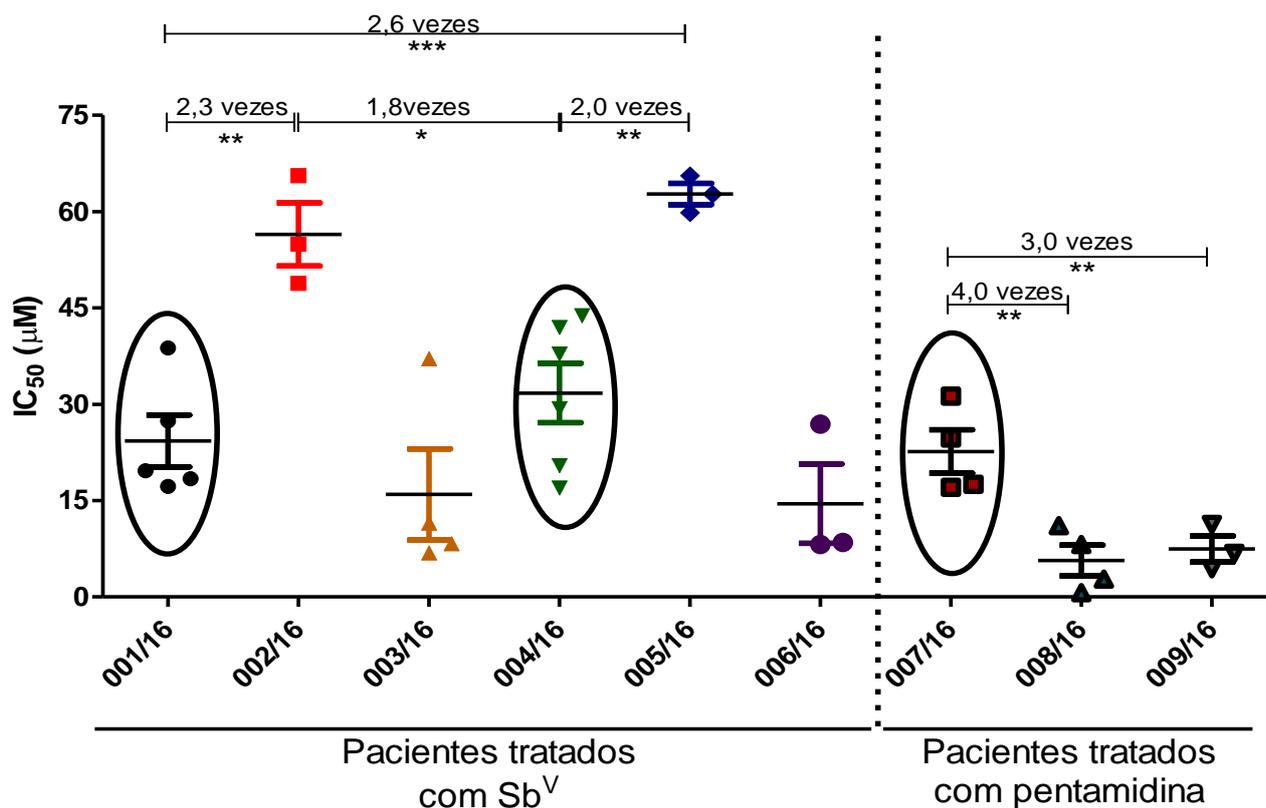


Figura 7: Análise do nível de susceptibilidade dos isolados de *L. guyanensis* ao Sb^{III}. Comparação do grau de sensibilidade *in vitro* frente à ação leishmanicida de Sb^{III} em isolados de *L. guyanensis* provenientes de pacientes com tratamento inicial por Sb^V ou pentamidina. Os isolados circundados 001/16 e 004/16 apresentaram cura clínica ao fim do primeiro esquema terapêutico com Sb^V. Os isolados 002/16; 003/16; 005/16 e 006/16 apresentaram falha terapêutica ao fim do primeiro esquema terapêutico com Sb^V. O isolado circundado 007/16 apresentou cura clínica após o primeiro esquema terapêutico com pentamidina. Já os isolados 008/16 e 009/16 apresentaram falha terapêutica após o primeiro esquema terapêutico de tratamento com pentamidina. Cada ponto da figura representa o IC₅₀ calculado para cada repetição do experimento de forma independente. As repetições variaram de 3 a 6 vezes. As barras representam médias e desvio-padrão. ***p < 0,001; **p < 0,01 e *p < 0,05.

Já com relação aos mesmos isolados tratados com pentamidina, não houve diferença significativa entre os valores de IC₅₀.

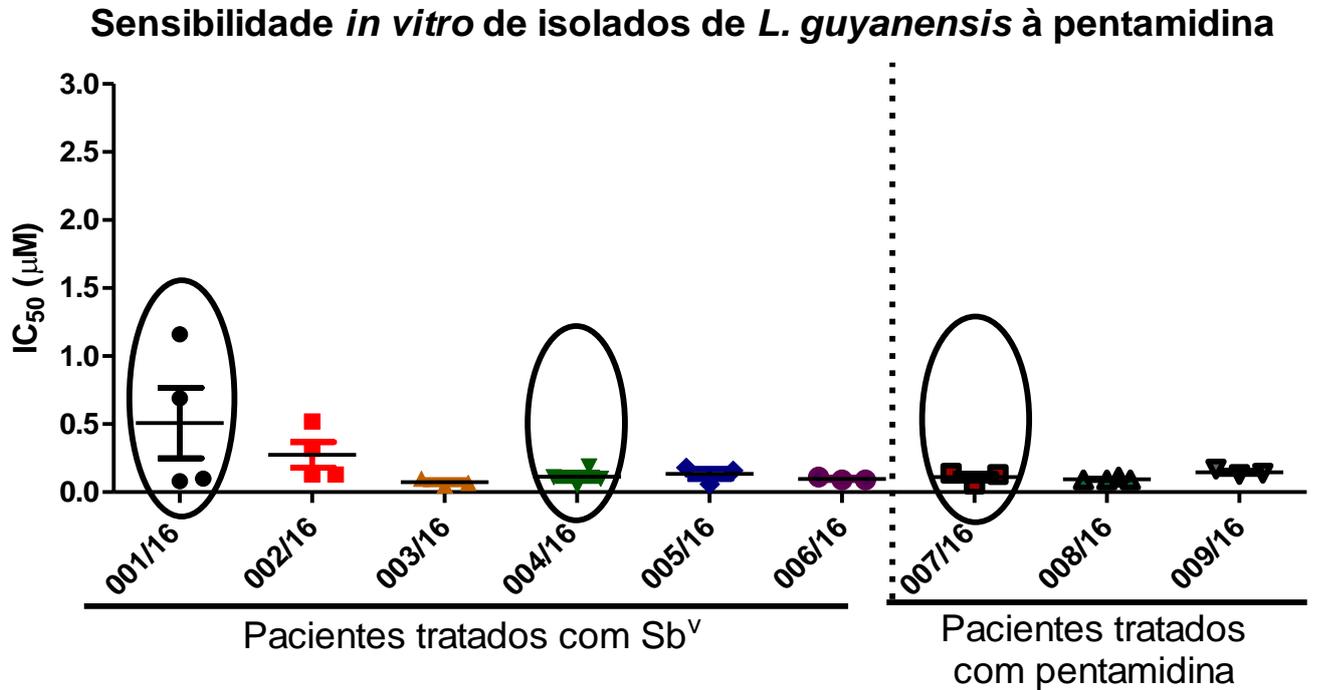
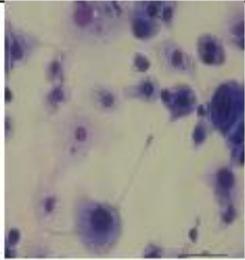
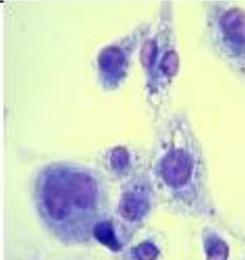
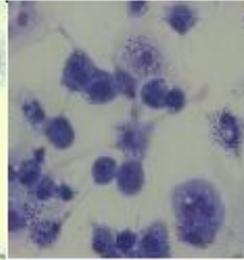
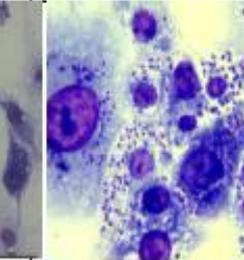
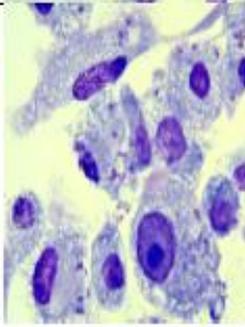
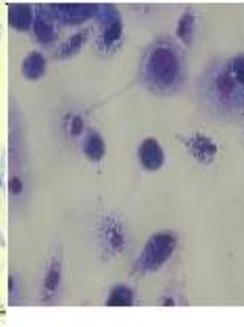
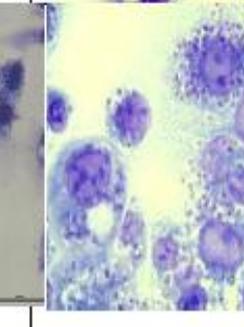


Figura 8: Análise do nível de susceptibilidade dos isolados de *L. guyanensis* à pentamidina. Comparação do grau de sensibilidade *in vitro* frente à ação leishmanicida de pentamidina em isolados de *L. guyanensis* provenientes de pacientes com tratamento inicial por Sb^V ou pentamidina. Os isolados circundado 001/16 e 004/16 apresentaram cura clínica ao final do primeiro esquema terapêutico. Os isolados 002/16; 003/16; 005/16 e 006/16 apresentaram falha terapêutica ao fim do primeiro esquema terapêutico. O isolado circundado 007/16 apresentou cura clínica após o primeiro esquema terapêutico com pentamidina. Já os isolados 008/16 e 009/16 apresentaram falha terapêutica após o primeiro esquema terapêutico com pentamidina. Cada ponto da figura representa o IC₅₀ de cada isolado independentes em triplicata com desvio-padrão. Cada ponto da figura representa o IC₅₀ calculado para cada repetição do experimento de forma independente.

7.2 Padronização da infecção de células da linhagem THP-1 por isolados de *Leishmania (Viannia) guyanensis*

Foi realizada uma proporção de infecção (3:1; 5:1; 7:1 e 10:1) de parasito em relação ao macrófago THP-1 (5×10^5) para definir a melhor relação entre os mesmos. Posteriormente foram calculados a taxa e o índice de infecção desses macrófagos para auxiliar na escolha da proporção a ser utilizadas nos ensaios de infecção para determinar a sensibilidade aos fármacos. Nesta padronização foram utilizados dois isolados, sendo: 001/16 (sucesso terapêutico) e 002/16 (falha terapêutica) conforme mostrado no Quadro 1.

Quadro 1. Padronização da relação parasito/macrófago nos ensaios de infecção por *Leishmania guyanensis*.

Proporção promastigotas/macrófago	3:1	5:1	7:1	10:1
Sucesso terapêutico (isolado 001/16)				
Falha terapêutica (isolado 002/16)				

Quadro 1: Proporção de infecção em macrófagos da linhagem THP-1 com formas promastigotas de *L. guyanensis*, isolados 001/16 – proveniente de paciente com cura clínica (A; B; C e D); e 002/16 -proveniente de paciente com falha terapêutica (E; F; G e H), nas proporções de 3:1; 5:1; 7:1 e 10:1, respectivamente. (Aumento com objetiva de 100x).

Para o isolado 001/16 (sucesso terapêutico) os valores de taxa e média de infecção para a proporção 3:1 (parasito/macrófago) foram: taxa de infecção= 54,17% e média de infecção= 4,91. Para a proporção 5:1 foram: taxa de infecção= 45,33% e média de infecção= 7,81. Para a proporção 7:1 foram: taxa de infecção= 52,92% e média de infecção= 8,34. E para a proporção de 10:1 foram: taxa de infecção= 91,88% e média de infecção= 13,99. Os valores de taxa e média de infecção para o isolado 002/16 (falha terapêutica) na proporção 3:1 (parasito/macrófago) foram: taxa de infecção= 38,92% e média de infecção= 1,97. Para a proporção 5:1 foram: taxa de infecção= 50% e média de infecção= 4,78. Para a proporção 7:1 foram: taxa de infecção= 55,92% e média de infecção= 5,34. E para a proporção 10:1 foram: taxa de infecção= 87,13% e média de infecção= 6,3 conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4: Valores da taxa e média de infecção com formas amastigotas por *Leishmania guyanensis* dos isolados de isolados 001/16-cura clínica (A; B; C e D) e 002/16-falha terapêutica (E; F; G e H) nas proporções de 3:1; 5:1; 7:1 e 10:1, respectivamente:

Proporção promastigotas/ macrófagos	3:1	5:1	7:1	10:1
Taxa e média de infecção (001/16-cura clínica)	A 54,17% 4,91	B 45,33% 7,81	C 52,92% 8,34	D 91,88% 13,99
Taxa e média de infecção (002/16- falha terapêutica)	E 38,92% 1,97	F 50% 4,78	G 55,92% 5,34	H 87,13% 6,3

Embora os ensaios de padronização da proporção parasito/macrófago de linhagem THP-1 tenham sido bem sucedidos, a reprodutibilidade da capacidade de infecção por diferentes isolados de *L. guyanensis* não foi alcançada. Em uma das réplicas não foi possível observar a infecção pela ineficiência do PMA em diferenciar a linhagem em macrófagos ativados e interromper a sua proliferação. Esse fato determinou uma alta concentração de células por lamínula, o que dificultou a visualização após coloração. Além disso, foi visto em alguns dos experimentos, que a capacidade de infecção foi inexistente, impossibilitando a continuidade dos experimentos. Dessa forma, foi colocado em questionamento se a linhagem de macrófago THP-1 teria a mesma susceptibilidade à infecção por diferentes isolados de *L. guyanensis*. Para tentar solucionar essa questão, foi utilizado outro modelo de infecção baseado na utilização de macrófagos de lavado peritoneal de camundongos BALB/c.

7.3. Avaliação do grau de susceptibilidade *in vitro* de formas amastigotas ao antimonial pentavalente e à pentamidina com macrófagos peritoneais murinos.

Os resultados de taxa e média de infecção obtidos com o modelo de infecção utilizando macrófagos residentes de peritônio de camundongos BALB/c quando infectados com o isolado 002/16 (falha terapêutica) na proporção de 10:1 foram: taxa de infecção= 86,9% e média de infecção= 8,9. Esses resultados foram similares aos observados quando utilizado os macrófagos da linhagem THP-1. Não foi possível determinar os dados de taxa e média de infecção do isolado 001/16 (sucesso terapêutico) devido à contaminação da cultura com bactérias.

8. Discussão

Na América Latina, o tratamento com Sb^V caracteriza-se por uma variação de resultados em relação a sua eficácia. No tratamento da leishmaniose cutânea, a eficácia dos antimoniais definida pelo índice de cura clínica variaram de 94,2% na Bolívia, 84% no Brasil, 75,6-78% no Peru e 61-67% na Colômbia (Ginouvès et al. 2017). Um ensaio clínico realizado no Brasil, com foco na região de Manaus, demonstrou índice de cura para o antimonial pentavalente de apenas 26,3% para tratamento de pacientes infectados por *L. guyanensis* (Romero et al., 2001). Mais recentemente em 2011, outro ensaio clínico realizado na mesma região comparando o antimonial pentavalente com a miltefosina em pacientes com LC causada por *L. guyanensis*, demonstrou que o índice de cura apresentado para o tratamento com Sb^V é de apenas 53,3%, e melhores taxas foram observadas quando utilizado miltefosina (70,7%) (Chrusciak-Talhari et al. 2011). Esse fenômeno de baixa eficácia terapêutica observado para o antimonial pentavalente no tratamento dos casos de LC da região de Manaus é reforçado em outros estudos, onde foi demonstrado índices de cura clínica de apenas 55,5% (Neves et al. 2011b). A baixa taxa de cura clínica observada quando pacientes de LC provenientes da região de Manaus são tratados com Sb^V podem ser explicadas, pelo menos em parte, pela possível particularidade relacionada ao patógeno. Nesse contexto, vale ressaltar que a espécie de maior prevalência na região de Manaus é a *L. guyanensis*, e que esta característica regional não é observada em nenhuma outra localidade do Brasil, nas quais a principal espécie responsável pelos casos de LTA é a *L. braziliensis*, e onde episódios de falha terapêutica são raramente relatados. A exceção é observada na região de Corte de Pedra, Bahia, onde foi observado taxa de cura de 50,8% após tratamento com Sb^V de pacientes infectados com *L. braziliensis* (Romero et al. 2001).

Essa diversidade de eficácia terapêutica observada com Sb^V em diferentes localizações geográficas, também se aplica para a pentamidina. Um ensaio clínico realizado na Guiana Francesa demonstrou índice de cura de 87% quando pacientes com LC foram tratados com isotionato de pentamidina, sendo estes infectados pelas espécies *L. braziliensis* ou *L. guyanensis* (Nacher et al. 2001). Na região de Manaus, o índice de cura clínica observado foi de 58,1% quando pacientes de LC foram tratados com pentamidina (Neves et al. 2011b).

Outro fator que pode ter associação com os casos de falha terapêutica é a presença de um vírus RNA presente em algumas espécies de *Leishmania*. Em um

estudo realizado no Peru e na Bolívia foi demonstrado que os pacientes de LC apresentavam risco aumentado (aproximadamente 4 vezes) de evoluir com falha terapêutica se a *L. braziliensis* isolada da lesão fosse portadora do RNA *Leishmania* vírus (LRV). Esse grupo de autores sugere que essa associação da falha ao tratamento com os fármacos leishmanicidas é resultado dos efeitos mediados pelo LRV no metabolismo do hospedeiro e/ou na sobrevivência do parasita (Adaui et al. 2016). O mesmo fenômeno da associação entre LRV e o aumento da chance de falha terapêutica foi observado na Guiana Francesa com casos de LC causados por *L. guyanensis* portadores de LRV. Contudo ainda não foi observada nenhuma resistência do parasito aos fármacos leishmanicidas devido à presença do LRV (Borreau et al. 2016). Vale ressaltar que embora ainda não tenha sido realizado o teste para detecção de LRV nos nove isolados de *L. guyanensis* utilizados no presente trabalho, em estudo anterior do nosso grupo foi identificada a presença de LRV em um isolado proveniente de paciente que evoluiu com falha terapêutica após ter sido tratado com Sb^V (Vieira-Gonçalves, et al, artigo em publicação).

A variabilidade dessa resposta terapêutica também pode estar associada a características genéticas do próprio patógeno, que podem conferir a ele certo grau de resistência aos fármacos. Embora não tenhamos nenhum trabalho que demonstre isolados de *Leishmania* provenientes do Brasil que apresente resistência aos fármacos leishmanicidas, em algumas regiões da Índia e Irã parasitos resistentes ao tratamento são bastante frequentes (González et al., 2009; Hadighi *et al.*, 2006). Dentre os isolados provenientes de pacientes que tiveram falha terapêutica e que foram avaliados *in vitro* quanto ao grau de sensibilidade ao antimonial, metade dos mesmos necessitaram de concentrações de Sb^{III} para inibir 50% do crescimento das formas promastigotas, significativamente maiores do que os isolados provenientes de indivíduos que obtiveram sucesso terapêutico. No entanto, não podemos afirmar que tais isolados são resistentes ao antimonial sem realizar estudos que comprovem bioquimicamente esta capacidade de resistir à ação do fármaco.

Por outro lado, ao observar que a outra metade dos isolados associados à falha terapêutica tiveram valores de IC₅₀ similares aos isolados associados com sucesso terapêutico, nos fez pensar que uma vez os patógenos sendo sensíveis ao antimonial, outros fatores inerentes ao paciente, como por exemplo, associados a resposta imune, poderiam contribuir para o episódio de falha terapêutica. Resultados do nosso grupo demonstraram que células mononucleares do sangue periférico de alguns pacientes com LC provenientes de Manaus, quando estimuladas *in vitro* com antígenos de

Leishmania, possuem uma baixa capacidade de produção de IFN- γ , citocina importante na ativação de macrófagos necessários para a conversão de Sb^V (forma inativa do antimonial) em Sb^{III} (forma leishmanicida) (Lima et al, dados em publicação).

Outra hipótese, voltando a fatores associados ao patógeno, é que o isolado de *Leishmania* obtido antes de iniciado o tratamento com o fármaco, não apresentaria ainda a característica de baixa sensibilidade ao Sb^V. E que somente após a exposição prolongada ao fármaco, em indivíduos que apresentaram falha terapêutica, um novo isolado passaria a apresentar a característica de menor sensibilidade ao fármaco. Essa idéia pode ser reforçada em um estudo que realizou o isolamento de *L. infantum* antes e após o tratamento da leishmaniose visceral em indivíduos que apresentaram falha terapêutica. Os ensaios de sensibilidade *in vitro* destes isolados demonstrou um aumento significativo de IC₅₀ após o término do tratamento quando comparado aos valores obtidos para os isolados de mesmo paciente obtidos antes do tratamento (Faraut-Gambarelli et al 1997). Essa indução de menor sensibilidade ao fármaco mediante exposição ao fármaco leishmanicida pôde ser comprovada *in vitro* pelo cultivo prolongado de espécies de *Leishmania* (incluindo subgênero *Viannia*) na presença de antimônio, ou seja, maiores valores de IC₅₀ foram observados depois de prolongada exposição do patógeno ao fármaco (Grögl et al. 1989).

Nesse contexto, o tratamento da leishmaniose apresenta várias características que contribuem para uma baixa adesão do paciente ao tratamento, como exemplo, a via de administração parenteral, os efeitos adversos numerosos e algumas vezes incapacitantes e o tempo prolongado. Além disso, dependendo da região em questão, outras limitações contribuem para a irregularidade do esquema de doses diárias consecutivas, como por exemplo, a impossibilidade de alguns pacientes terem acesso ao posto de saúde para tomar as doses diárias, como é o caso das populações ribeirinhas. Em conjunto, estas características podem de alguma forma contribuir para os frequentes episódios de falhas terapêuticas observadas (Basano & Camargo 2004).

Poucos são os estudos que avaliam a susceptibilidade *in vitro* de isolados do subgênero *Viannia* e tampouco de *L. guyanensis* frente aos fármacos leishmanicidas. O único trabalho encontrado de Azeredo-Coutinho e colaboradores (2007) demonstraram que promastigostas de isolados de *L. braziliensis* obtidos de pacientes do Rio de Janeiro apresentaram valores de IC₅₀ entre de 0,8 a 9,5 mg /mL de antimonial pentavalente (Glucantime[®]) após período de incubação de 72 horas. Vale destacar que os resultados obtidos por este trabalho de sensibilidade de formas promastigotas ao Sb^V podem estar fragilizados por não terem utilizado o fármaco reduzido em Sb^{III}.

Existe a necessidade da formulação pentavalente ser metabolizada pelo macrófago e transformada na formulação trivalente, que é a forma ativa contra o parasito (Ouellette et al. 2004). Mesmo assim, nesse estudo, outras espécies de referência como: *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*, também foram avaliadas quanto ao grau de sensibilidade ao antimonial e os valores de IC₅₀ variaram entre 10 a 60 mg /mL. O valor de IC₅₀ para *L. guyanensis* foi de 2,5 a 30 vezes maior quando comparado aos valores descritos para *L. braziliensis*, sugerindo que a *L. guyanensis* seja menos susceptível ao antimonial.

Uma vez que na prática clínica observa-se uma alta taxa de cura para LC causada por *L. braziliensis* quando tratados com 10 a 20 mg/kg/dia/Sb^V, e que o mesmo esquema terapêutico resulta em baixos índices de cura clínica se usado para tratar pacientes infectados por *L. guyanensis*, somado a informação sobre *L. guyanensis* ser menos susceptível ao antimonial, seria pertinente pensar que as doses pré estabelecidas deste fármaco nos protocolos de tratamento não sejam as ideais para terapia dos casos por *L. guyanensis*? Nesse contexto, pensar que 10 a 20 mg/kg/dia/Sb^V poderia configurar subdose para manter efeito leishmanicida em infecções causadas por *L. guyanensis*, e que o aumento dessas doses *in vivo* seria impossível devido aos efeitos adversos, nos induz a sugerir que o Sb^V não seja a droga ideal para tratamento de casos de LTA causados por *L. guyanensis*.

Na Guiana Francesa e no Suriname, o isotionato de pentamidina é utilizado desde 1992 para o tratamento da leishmaniose cutânea causado por *L. guyanensis* (Dedet et al, 1989). Em um ensaio *in vitro* avaliando sete fármacos (anfotericina B, azitromicina, fluconazol, antimoniato de meglumina, miltefosina, paromomicina e pentamidina) para tratamento de 33 isolados de *L. guyanensis*, os valores de IC₅₀ variaram amplamente para cada fármaco já pentamidina que é o tratamento de primeira escolha na Guiana Francesa, apresentou valores de IC₅₀ em doses muito baixas (Ginouvés et al. 2017). Comparativamente, os nossos resultados também demonstraram a heterogeneidade de IC₅₀ para Sb^{III} e pentamidina, independente do desfecho clínico após tratamento. Além disso, considerando as faixas de concentrações dos fármacos utilizadas para tratamento *in vitro* dos isolados, observou-se que as concentrações de pentamidina capazes de inibir em 50% o crescimento dos parasitos foram mais próximas da menor concentração utilizada. Em conjunto, esses dados sugerem que a *L. guyanensis* pode ser uma espécie mais susceptível à pentamidina do que ao Sb^V.

As espécies de *Leishmania* podem influenciar o resultado do tratamento com os fármacos leishmanicidas atualmente utilizados para tratamento de pacientes com LC.

Logo, a identificação da espécie de *Leishmania* é de extrema importância, pois auxiliará o clínico na escolha da droga de melhor eficácia (Arevalo et al. 2007).

Vale ressaltar que a ação *in vitro* do Glucantime[®] em formas promastigotas é de 73 a 271 vezes menor do que a atividade em formas amastigotas (Ephros et al. 1999). Não há dúvida de que os resultados obtidos de ensaios *in vitro* de avaliação da sensibilidade de formas amastigotas intracelulares frente aos fármacos leishmanicidas seriam os mais próximos do que ocorre *in vivo* com pacientes tratados, embora não equivalentes.

Ensaio *in vitro* de susceptibilidade de isolados de *Leishmania* aos antimoniais e outros fármacos leishmanicidas têm sido empregados na tentativa de se estabelecer uma relação entre sensibilidade do parasito e resposta terapêutica dos pacientes (Azeredo-Coutinho et al. 2007; Rijal et al. 2007). Nesse contexto nossas amostras de isolados de pacientes com LC com os fármacos leishmanicidas, foram empregadas em ensaios *in vitro* com intuito de correlacionar com o desfecho clínico dos pacientes (falha terapêutica ou sucesso terapêutico). Embora tenha sido realizados ensaios *in vitro* com formas promastigotas, essa não é a forma evolutiva presente no hospedeiro durante o processo de tratamento. Dessa forma, o melhor modelo para ensaios *in vitro* seriam macrófagos ou linhagens fagocíticas infectadas com *Leishmania*. Entretanto tentado utilizar macrófagos de linhagem THP-1 para ensaios de infecção, não conseguimos avançar nos ensaios após a padronização, ou seja, os resultados não se reproduziam. Acreditamos que cada isolado tenha diferentes capacidades infectivas diante de uma mesma linhagem celular. Essa dificuldade de padronizar infecções *in vitro* também foi vista em outro ensaio de infecção por *L. braziliensis* utilizando macrófagos de linhagem THP-1 comparados a macrófagos de lavado peritoneal de camundongos BALB/c onde as taxas de infecção foram de 10 e 84%, respectivamente (Zauli-Nascimento et al. 2010).

No presente trabalho, novas tentativas de padronização foram realizadas com macrófago residente de lavado peritoneal de camundongos BALB/c. Apesar de observado uma taxa de infecção semelhante a THP-1 com um dos isolados, episódios de contaminação das culturas com bactérias e tempo restrito para realização dos experimentos em triplicata nos forçou a interromper a ideia da utilização de amastigotas para avaliação da sensibilidade as fármacos leishmanicidas.

Estudos de associação entre o desfecho clínico após tratamento da LTA e o grau de susceptibilidade *in vitro* de isolado de *Leishmania* frente aos fármacos leishmanicidas tem sido realizado com emprego de amastigotas intracelulares para

definição de IC₅₀. Alguns desses estudos avaliaram *in vitro* o grau de susceptibilidade de *L. donovani* ou *L. major* frente ao fármaco leishmanicida, e demonstraram que os isolados provenientes de indivíduos com má resposta ao tratamento apresentavam maiores valores de IC₅₀ quando estes resultados foram definidos pelo índice de infecção de macrófagos murinos infectados com amastigotas, e essa mesma associação não foi observada para as formas promastigotas axênicas (Ibrahim et al. 1994, Lira et al. 1999). Por outro lado, a determinação de IC₅₀ a partir de formas promastigotas de *L. braziliensis* demonstrou correlação desses valores com o desfecho clínico (Grögl et al. 1989). Outros autores sugerem que esta associação entre resultados de susceptibilidade *in vitro* com o desfecho clínico após tratamento da LTA não é possível de ser realizada (Berman 1982, Robledo et al. 1999, Zauli-Nascimento et al. 2010). Isso sugere que dependendo da espécie de *Leishmania* investigada e dos fármacos utilizadas para tratamento *in vitro* de formas promastigotas, é possível gerar resultados de IC₅₀ correlacionáveis com o desfecho clínico observado em pacientes após tratamento da LTA.

Estudos de avaliação *in vitro* de susceptibilidade aos fármacos para espécies como *L. guyanensis* que pode estar implicando em frequentes episódios de falha terapêutica na região de Manaus, podem auxiliar no estabelecimento de novas recomendações para o tratamento da LTA. O intuito de tais estudos é minimizar os prejuízos para os pacientes que com frequência são submetidos a vários ciclos de tratamento com fármacos nem sempre eficazes e que apresentam vários efeitos adversos. Nesse aspecto, a OMS recomenda que pesquisas de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses sejam incentivadas (Frézard et al. 2009).

9. Conclusão

- ✓ Nos ensaios de susceptibilidade de isolados de *L. (V.) guyanensis* com formas promastigotas não foi vista associação entre o grau de susceptibilidade dos isolados com o desfecho clínico dos pacientes.
- ✓ Os isolados de *L. guyanensis* provenientes de pacientes de LC apresentaram uma heterogeneidade quanto aos valores de IC₅₀.

10. Perspectivas:

- ✓ Caracterização molecular por PCR dos isolados provenientes de pacientes com leishmaniose cutânea atendidos na FMT-HVD-Manaus quanto à espécie.
- ✓ Realização de ensaios *in vitro* com os fármacos leishmanicidas (Antimonial trivalente e pentavalente, Anfotericina B e Pentamidina) nos isolados nas formas promastigotas e amastigotas.
- ✓ Caracterização molecular de transportadores ABC e análise dos níveis intracelulares dos fármacos leishmanicidas em populações de *Leishmania* spp com diferentes níveis de susceptibilidade aos fármacos leishmanicidas.
- ✓ Investigação da presença do *Leishmaniavírus* (LRV) nos isolados de *Leishmania* spp e sua relação com o desfecho clínico no tratamento da leishmaniose

11. Referências bibliográficas

- Adaui V, Lye LF, Akopyants NS, Zimic M, Llanos-Cuentas A, Garcia L, Maes I, Doncker S De, Dobson DE, Arevalo J, Dujardin JC, Beverley SM 2016. Association of the endobiont double-stranded RNA virus LRV1 with treatment failure for human leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia. *J. Infect. Dis.* 213: 112–121.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M de 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos one.* Vol 5: 5-35671.
- Arevalo J, Ramirez L, Adaui V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, Doncker S De, 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.* 195: 1846–1851.
- Azeredo-Coutinho RBG, Mendonça SCF, Callahan H, Portal AC, Grögl M 2007. Sensitivity of *Leishmania Braziliensis* Promastigotes To Meglumine Antimoniate (Glucantime) Is Higher Than That of Other *Leishmania* Species and Correlates With Response To Therapy in American Tegumentary Leishmaniasis. *J. Parasitol.* 93: 688–693.
- Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM 1995. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 53: 256-259.
- Basano SDA, Camargo LMA 2004. *Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle.* *Rev Bras Epidemiol;* 7(3): 328-337.
- Berman JD 1982. *In vitro* susceptibility of antimony-resistant leishmania to alternative drugs. *J. Infect. Dis.* 145: 279.
- Bourreau E, Ginouves M, Prévot G, Hartley MA, Gangneux JP, Robert-Gangneux F, Dufour J, Sainte-Marie D, Bertolotti A, Pratlong F, Martin R, Schütz F, Couppié P, Fasel N, Ronet C 2016. Presence of *Leishmania* RNA virus 1 in *Leishmania guyanensis* increases the risk of first-line treatment failure and symptomatic relapse. *J. Infect. Dis.* 213: 105–111.
- Brasil 2013. Ministerio da Saude. Secretaria de Vigilancia em Saude. Departamento de Vigilancia Epidemiologica. Manual de Vigilancia da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministerio da Saude, Secretaria de Vigilancia em Saude, Departamento de Vigilancia Epidemiologica. – 2. ed. atual., 3. reimpr. – Brasilia : Editora do Ministerio da Saude. 2014. 180 p. : il.
- Brasil 2014. Ministério da Saúde M, Secretaria de Vigilância em Saúde S. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª edição atualizada ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde.

- CDC. Life cycle. 2017. Available in: Global Health Division of Parasitic Diseases. January: cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html.
- Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Talhari CC, Silva RM Da, Yamashita EPG, Oliveira Penna G De, Machado PRL, Talhari S 2011. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84: 255–260.
- Costa, A. A. et al. 2005. Imaging exams of bone lesions in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). *Acta Tropica*, 96 (1): 9-15.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH 2006. Drug Resistance in Leishmaniasis Drug Resistance in Leishmaniasis. *Society* 19: 111–126.
- Da-Cruz AM, Pirmez C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Coura JR, ed. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2005:697-712.
- Ephros M, Bitnun A, Shaked P, Waldman E, Zilberstein D 1999. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 278–282.
- Faraut-Gambarelli F, Piarroux R, Deniau M, Giusiano B, Marty P, Michel G, Faugère B, Dumon H 1997. *In vitro* and *in vivo* resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: A study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 827–830.
- Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR 2009. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. *Molecules* 14: 2317–2336.
- Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O 2004. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Res. Microbiol.* 155: 224–230.
- Gebre-Hiwot a., Tadesse G, Croft SL, Frommel D 1992. An *in vitro* model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. *Acta Trop.* 51: 237–245.
- Ginouès M, Simon S, Nacher M, Demar M, Carme B, Couppié P, Prévot G 2017. *In vitro* Sensitivity of Cutaneous *Leishmania* Promastigote Isolates Circulating in French Guiana to a Set of Drugs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*: 16–373.
- Gonzalez U, Gonzalez U, Pinart M, Pinart M, Rengifo-Pardo MN, Rengifo-Pardo MN, Macaya A, Macaya A, Alvar J, Alvar J, Tweed J a, Tweed J a 2009. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database Syst Rev*: CD004834.
- Goto, H., Lindoso J 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8: 419–433.

- Grimaldi G, Jr., Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical microbiology reviews*. 1993 Jul;6(3):230-50.
- Grögl M, Oduola AMJ, Cordero LDC, Kyle DE 1989. Leishmania spp.: Development of pentostam-resistant clones *in vitro* by discontinuous drug exposure. *Exp. Parasitol.* 69: 78–90.
- Guerra JAO, Prestes S, Silveira H, Coelho L, Gama P, Moura A, Amato V, Barbosa MG, Ferreira LC. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Neglec trop diseases*. 2011; 5 (3): 980.
- Hadighi R, Mohebbali M, Boucher P, Hajjaran H, Khamesipour A, Ouellette M 2006. Unresponsiveness to glucantime treatment in Iranian cutaneous Leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med.* 3: 659–667.
- Ibrahim M E, M Hag-Ali, A M El-Hassam, T G. Theander, A Kharazmi 1994. *Leishmania* resistant to sodium stibogluconate: Drug-associated macrophage-dependent killing. *Parasitol. Res.* 80: 569–574.
- Jones TC, Johnson WD, Jr., Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, et al 1987. Epidemiology of American cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis.* 156(1):73-83.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, eds. The leishmaniasis in biology and medicine. *Academic Press*:1-120.
- Lira R, Sundar S, Makharia a, Kenney R, Gam a, Saraiva E, Sacks D 1999. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J. Infect. Dis.* 180: 564–567.
- Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Uliana SRB 2008. Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2.
- Moreira ES a, Anacleto C, Petrillo-Peixoto ML De 1998. Effect of glucantime on field and patient isolates of New World *Leishmania*: Use of growth parameters of promastigotes to assess antimony susceptibility. *Parasitol. Res.* 84: 720–726.
- Nacher M, Carme B, Marie D Sainte, Couppie P, Clyti E, Guibert P, Pradinaud R 2001. Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Ann Trop Med Parasitol* 95: 331–336.
- Neves LO, Talhari AC, Gadelha EPN, Silva RM da, Guerra JADO, Ferreira LCDL, Talhari S 2011a. 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: 1092–1101.

- Neves LO, Priscilla E, Gadelha N, Augusto J, Guerra DO, Talhari AC, Moreira R 2011b. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An. Bras. Dermatol.* 86 (6): 1092-1101.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC, Pirmez C. 1997a 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* 45(6):496-499.
- Oliveira-Neto MP, Mattos M, Souza CS, Fernandes O, Pirmez C. 1998. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous Leishmaniasis. *Int J Dermatol* 37 (11):846-849.
- Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-Cruz AM, Fernandes O, Moreira J, et al. 2000. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermatol* 39(7):506-514.
- Oliveira L De, Pereira R, Maretti-mira AC, Rodrigues KM, Lima RB, Oliveira-neto MP De, Cupolillo E, Pirmez C, Oliveira MP De 2013. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with *Leishmania* RNA virus 1 infection in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 108: 665-667.
- Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B 2004. Leishmaniasis: Drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Updat.* 7: 257–266.
- PAHO, 2016. Leishmanioses. Informe epidemiológico das Américas. 4.
- Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jesús MN De, Marzal C, Medicina I De, São T De, Paulo UDS, Enéas A, Aguiar DC, Sp SP 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado Da Arte. *Quim. Nova* 26: 550–555.
- Rijal S, Yardley V, Chappuis F, Decuypere S, Khanal B, Singh R, Boelaert M, Doncker S De, Croft S, Dujardin JC 2007. Antimonial treatment of visceral leishmaniasis: are current *in vitro* susceptibility assays adequate for prognosis of *in vivo* therapy outcome? *Microbes Infect.* 9: 529–535.
- Robledo SM, Valencia a Z, Saravia NG 1999. Sensitivity to Glucantime of *Leishmania Viannia* isolated from patients prior to treatment. *J Parasitol* 85: 360–366.
- Romero G a S, Farias Guerra M V. De, Paes MG, Oliveira Macêdo V De 2001. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: Therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J. Trop Med Hyg* 65: 456-465.
- Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira AL, et al. 1998a. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg* 58(6): 824-827.

- Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraive W, Pirmez C, Grimaldi G, Jr., et al. 1998b. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis.* 178(3):911-914.
- Silva, D.1978. Leishmaniose anérgica hansenóide. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 53: 161-168.
- Stockdale L, Newton R 2013. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. *PLoS Negl Trop Dis* 7: 1-15.
- WHO. Neglected Tropical Diseases. 2010. Available in: World Wide Web, December: who.int/neglected_diseases/diseases/en/.
- WHO 2016. *WHO: Weekly epidemiological record* . N° 22, 91; 285-296.
- Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Pereira LI a, Pelli De Oliveira M a., Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SRB 2010. *In vitro* sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop. Med. Int. Heal.* 15: 68–76.

12. Anexo A

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de fatores associados à falha terapêutica em pacientes com Leishmaniose Cutânea

Pesquisador: MARA LUCIA GOMES DE SOUZA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 29638514.0.0000.0005

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 613.013

Data da Relatoria: 11/04/2014

Apresentação do Projeto:

conforme parecer # 560.914, de 28/03/2014.

Objetivo da Pesquisa:

conforme parecer # 560.914, de 28/03/2014.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

conforme parecer # 560.914, de 28/03/2014.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de Projeto de Pesquisa que contribuirá com o conhecimento sobre o Tratamento e acompanhamento dos portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana - LTA e representa a dissertação de mestrado de aluna do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical (PPGMT). Entretanto, na avaliação realizada anteriormente (28/03/14), o pesquisador apresentou cronograma que sugeria q a pesquisa já havia se iniciado e o protocolo foi retrado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Nesta nova submissão, o pesquisador apresenta todos os termos obrigatórios, o cronograma da pesquisa devidamente adequado, bem como prestou esclarecimento à coordenação deste CEP sobre o status da pesquisa em questão, garantindo q não houve início da coleta de dados.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmit.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 013.013

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que o protocolo e, particularmente, seu cronograma foi devidamente ajustado e esclarecido q não houve início arbitrário da pesquisa, voto pela **APROVAÇÃO** na forma ora apresentada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está **APROVADO** e os Interessados ficam Informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando os modelos disponíveis em nossa homepage, na aba "Modelos de Documentos". Se houver qualquer tipo de dúvida o pesquisador deve entrar em contato com o CEP/FMT-HVD, que lhe oferecerá as orientações necessárias.

MANAUS, 11 de Abril de 2014

Assinador por:
Maria Paula Gomes Mourão
(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (02)2127-3572 Fax: (02)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br