

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**EFICÁCIA PRÉ-CLÍNICA DO TRATAMENTO TÓPICO DA LEISHMANIOSE
CUTÂNEA COM GEL HIDROFÍLICO DE PAROMOMICINA EM COMBINAÇÃO COM
LEISHMANICIDAS DE USO SISTÊMICO E LOCAL**

por

Líndicy Leidicy Alves

Belo Horizonte

2018

LÍNDICY LEIDICY ALVES

**EFICÁCIA PRÉ-CLÍNICA DO TRATAMENTO TÓPICO DA LEISHMANIOSE
CUTÂNEA COM GEL HIDROFÍLICO DE PAROMOMICINA EM COMBINAÇÃO COM
LEISHMANICIDAS DE USO SISTÊMICO E LOCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração Doenças Infecto-Parasitárias e crônicas não transmissíveis.

Orientação: Dra. Ana Lúcia Teles Rabello

Coorientação: Dra. Eliane de Moraes Teixeira

Belo Horizonte

2018

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

A474e Alves, Líndicy Leidicy
2018

Eficácia pré-clínica do tratamento tópico da leishmaniose cutânea com gel hidrofílico de paromomicina em combinação com leishmanicidas de uso sistêmico e local / Alves, Líndicy Leidicy. – Belo Horizonte, 2018.

XI, 87 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 76 - 86

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis/ DIP-DCNT.

1. Leishmaniose cutânea 2. Tratamento 3. Combinação I. Título II. Rabello, Ana Lúcia Teles (Orientação). III. Teixeira, Eliane de Moraes (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

LÍNDICY LEIDICY ALVES

**EFICÁCIA PRÉ-CLÍNICA DO TRATAMENTO TÓPICO DA LEISHMANIOSE
CUTÂNEA COM GEL HIDROFÍLICO DE PAROMOMICINA EM COMBINAÇÃO COM
LEISHMANICIDAS DE USO SISTÊMICO E LOCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração Doenças Infecto-Parasitárias e crônicas não transmissíveis.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Ana Lúcia Teles Rabello (IRR/FIOCRUZ MINAS) Presidente
Prof. Dra. Juliana Quero Reimão (Faculdade de Medicina de Jundiaí /SP) Titular
Prof. Dra. Marta Marques Gontijo de Aguiar (UFMG) Titular
Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira (UFMG) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2018.

Dedico esse trabalho:

Ao Simão por seu companheirismo

&

aos pacientes portadores de leishmaniose cutânea.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, minha maior incentivadora, por seu amor imensurável e pelos esforços desmedidos. Obrigada por ser minha melhor amiga, por todos os ensinamentos e por estar sempre ao meu lado. Agradeço a Deus pelo nosso encontro de almas.

Ao Simão, pelo amor, incentivo, apoio e paciência. Obrigada por ser meu companheiro, meu amigo e meu porto seguro. Você fez meus dias difíceis serem mais leves.

Ao meu irmão, meu caçula, por estar comigo em todos os momentos. Obrigada por todas as vezes que foi mais maduro e soube me aconselhar, pelos dias difíceis que sofreu em silêncio querendo transmitir que estava tudo bem. Nós passamos pelos momentos mais difíceis juntos, e sempre será assim.

Ao meu pai, meu exemplo de esforço e humildade, por seu amor e por compreender minha ausência.

À minha “Dinha”, aos meus afilhados e meus avôs, pelo amor, acolhimento e alegrias. Sinto por ter sido tão ausente.

Aos meus sogros, por serem tão queridos comigo e com toda minha família. Obrigada, pelas palavras de apoio e incentivo.

À Dra. Eliane Teixeira, minha coorientadora, pela contribuição para minha formação científica, pela oportunidade e a confiança no meu trabalho. Obrigada pelos conselhos, por me ouvir nos dias difíceis, por compreender meu momento e por sua amizade. Obrigada pelo carinho e pelos doces maravilhosos.

À Dra. Ana Rabello, minha orientadora, por sua serenidade, pela paciência e pelos ricos ensinamentos. Obrigada por sua paz, por me acalmar e pelo empenho nos momentos mais decisivos da elaboração deste trabalho.

Aos meus queridos amigos, verdadeiros presentes de Deus na minha vida: Verônica, Mariana Freire, Juliana, Carolina, Nayara, Diana, Dian, Eduardo, Eliza, Lara, Karine e Rosiana. Obrigada pela amizade, pelo carinho, pelo acolhimento nos meus dias difíceis, vocês são pessoas singulares e foram essenciais nessa jornada.

À todos do Grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias, pelos ensinamentos, apoio e agradável convivência.

Ao Dr. Daniel Avelar, por se mostrar sempre acessível, pelos conselhos, ensinamentos e amizade.

À minhas amigas, Ana, Mariana e Stella, por serem tão presentes na minha vida e me encorajarem sempre.

À Carla Soares, pela amizade, companheirismo, apoio e carinho. Você tornou meus dias mais alegres.

À madrinha Claude e padrinho Pedro e seus filhos e netos, minha família de coração.

Ao Biotério de Produção e Experimentação do Instituto René Rachou, em especial a Ana Paula Araujo e Rosângela Pereira.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e o Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Dra. Marta Aguiar, por ter cedido isolados de *L. (L.) major*.

À Farmanguinhos-Fiocruz pela formulação do gel hidrofílico de paromomicina.

Aos membros da banca (Dra. Juliana Reimão, Dra. Marta Aguiar, Dr. Lucas Ferreira) pela disponibilidade e avaliação desde trabalho.

A todos que, de alguma forma contribuíram para concretização desta realização profissional.

... se a paciência aprimora a vida, o tempo tudo transforma.

Psicografia Chico Xavier

Espírito Neio Lucio

RESUMO

Os medicamentos disponíveis para o tratamento da leishmaniose cutânea apresentam eficácia insatisfatória, efeitos adversos frequentes e graves e requerem longos esquemas terapêuticos. Assim, a busca por novas alternativas de tratamento para a leishmaniose cutânea é considerada prioritária pela Organização Mundial da Saúde. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia pré-clínica do gel hidrofílico de paromomicina tópico (PA), da anfotericina B lipossomal intraperitoneal (AnfLipo) e do antimoniato de meglumina intralesional (Glu IL) em esquema de monoterapia e em combinação para o tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. O estudo foi composto pela avaliação de monoterapias por diferentes esquemas terapêuticos e por combinações binárias. Na avaliação dos medicamentos em monoterapia, os hamsters experimentalmente infectados na base a cauda com *L. (V.) braziliensis*, foram tratados com PA (duas vezes ao dia, durante 30 dias consecutivos), AnfLipo (dose única ou intervalar, ambas com dose total de 10 mg/kg) e Glu IL (infiltração única, semanal ou quinzenal). A eficácia clínica foi avaliada através da medida do tamanho da lesão e a eficácia parasitológica por diluição limitante de cultivo de parasitas. O grupo de animais tratados com PA apresentou tendência de redução do tamanho das lesões, sem diferença estatística significativa em relação ao grupo controle, mas não observou-se redução de carga parasitária na lesão e no baço dos animais ($p > 0,05$). Para AnfLipo, não houve diferença estatística do tamanho das lesões entre os diferentes esquemas de tratamento, mas houve diferença entre os grupos tratados e o grupo controle ($p < 0,05$). Já na avaliação parasitológica, este medicamento foi eficaz em reduzir a carga de parasitas no baço ($p < 0,05$). O Glu IL, administrado semanalmente ou quinzenalmente, levou à cura completa de 80% e 100% dos animais, respectivamente. A infiltração única reduziu as lesões até 28 dias após tratamento, mas a partir daí houve reativação das mesmas. A redução do tamanho das lesões obtida com os esquemas de tratamento intralesional semanalmente ou quinzenalmente foi estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$). Na avaliação parasitológica com Glu IL, não houve redução significativa da carga de parasitas na lesão e no baço ($p > 0,05$). No estudo de combinações binárias, os seguintes regimes de tratamentos foram adotados: PA (duas vezes ao dia, durante 30 dias consecutivos), AnfLipo (dose única - 10 mg/kg) e Glu IL (infiltração única). Os animais tratados com as combinações (PA+Glu IL, PA+AnfLipo e Glu IL+AnfLipo) apresentaram 100% de redução do tamanho da lesão ($p < 0,05$), enquanto os animais tratados por monoterapias apresentaram redução de 29% (PA), 50% (Glu IL) e 72% (AnfLipo). Redução significativa da carga parasitária no baço ocorreu nos grupos tratados com AnfLipo ($p < 0,05$). Conclui-se que as combinações avaliadas foram mais efetivas na cicatrização das lesões do que os medicamentos em monoterapia e que essas combinações representam uma alternativa para o tratamento da leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) braziliensis* e encorajam futuros ensaios clínicos.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea; Tratamento; Combinação.

ABSTRACT

Medications available for the treatment of cutaneous leishmaniasis present unsatisfactory efficacy, frequent and severe adverse effects, and require lengthy therapeutic schemes. The aim of the present study was to evaluate the preclinical efficacy of the topical paromomycin hydrophilic gel (PA), intraperitoneal liposomal amphotericin B (AnfLipo) and intralesional meglumine antimoniate (Glu IL) in monotherapy and in combination for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. (V.) braziliensis*. The study was composed by the evaluation of monotherapies by different therapeutic schemes and by binary combinations. In the evaluation of monotherapy medicinal products, animals experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis* were treated with PA (twice daily for 30 consecutive days) AnfLipo (single dose or interval dose, both with a total dose of 10 mg / kg) and Glu IL (single, weekly or fortnightly infiltration). Clinical efficacy was assessed by measuring lesion size and parasitological efficacy by limiting dilution of parasite culture. The group of animals treated with PA showed a tendency to reduce lesion size, without significant statistical difference in relation to the control group, but no parasite load reduction was observed in the lesion and spleen of the animals ($p > 0.05$). For AnfLipo, there was no statistical difference in lesion sizes between the different treatment schemes, but there was difference between the treated groups and the control group ($p < 0.05$). In the parasitological evaluation, this medication was effective in reducing the burden of parasites in the spleen ($p < 0.05$). Glu IL, given weekly or fortnightly, led to complete cure of 80% and 100% of the animals, respectively. The single infiltration reduced the lesions until 28 days after treatment, but from that moment there was reactivation of the same ones. The reduction of lesion size obtained with the weekly or fortnightly intralesional treatment schemes was statistically different from the control group ($p < 0.05$). In the parasitological evaluation with Glu IL, there was no significant reduction of parasite load in the lesion and spleen ($p > 0.05$). In the study of binary combinations, the following treatment schemes were adopted: PA (twice daily for 30 consecutive days), AnfLipo (single dose - 10 mg / kg) and Glu IL (single infiltration). The animals treated with the combinations (PA + Glu IL, PA + AnfLip and Glu IL + AnfLipo) showed 100% reduction in lesion size ($p < 0.05$), while the monotherapy treated animals presented reduction of 29% (PA), 50% (Glu IL) and 72% (AnfLipo). Significant reduction of parasitic load on the spleen occurred in the groups treated with AnfLipo ($p < 0.05$). It is concluded that the combinations evaluated were more effective in wound healing than the monotherapy drugs and that these combinations represent an alternative for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. (V.) braziliensis* and encourage future clinical trials.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis; Treatment; Combination.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 Tamanho médio das lesões de hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> e tratados com gel hidrofílico de paromomicina tópico ou antimoniato de meglumina intramuscular	50
GRÁFICO 2 Tamanho médio das lesões de camundongos infectados com <i>L. (L.) major</i> e tratados com gel hidrofílico de paromomicina tópico.....	51
GRÁFICO 3 Parasitas viáveis na lesão e baço de hamsters infectados por <i>L. (V.) braziliensis</i> e tratados com gel hidrofílico de paromomicina tópico ou antimoniato de meglumina intramuscular	53
GRÁFICO 4 Parasitas viáveis na lesão e baço de camundongos infectados com <i>L. (L.) major</i> e tratados com gel hidrofílico de paromomicina tópico	54
GRÁFICO 5 Tamanho médio das lesões de hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> e tratados com anfotericina B lipossomal intraperitoneal	55
GRÁFICO 6 Parasitas viáveis na lesão e baço de hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> e tratados com anfotericina B lipossomal intraperitoneal	57
GRÁFICO 7 Tamanho médio das lesões de hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> e tratados antimoniato de meglumina intralesional	59
GRÁFICO 8 Parasitas viáveis na lesão e baço de hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> e tratados com antimoniato de meglumina intralesional	61
GRÁFICO 9 Tamanho médio das lesões de hamsters infectados <i>L. (V.) braziliensis</i> e tratados com gel hidrofílico de paromomicina tópico, anfotericina B lipossomal intraperitoneal ou antimoniato de meglumina intralesional.....	63
GRÁFICO 10 Parasitas viáveis na lesão e baço de hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> e tratados com gel hidrofílico de paromomicina tópico, anfotericina B lipossomal intraperitoneal ou antimoniato de meglumina intralesional.....	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Eficácia clínica da formulação do gel hidrofílico de paromomicina no tratamento de animais infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) major</i>	52
TABELA 2 Eficácia clínica de esquemas de tratamentos utilizando a anfotericina B lipossomal em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	56
TABELA 3 Eficácia clínica do antimoniato de meglumina por via intralesional no tratamento de hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	60
TABELA 4 Eficácia clínica de esquemas de tratamento utilizando o gel de paromomicina, anfotericina B lipossomal e antimoniato de meglumina intralesional em hamsters experimentalmente infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
AM	Amazonas
AnfLipo	Anfotericina B lipossomal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BA	Bahia
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
BOD	Demanda biológica de oxigênio
CI	Concentração inibitória
DF	Distrito Federal
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
kg	Quilograma
Glu	Antimoniato de meglumina
GluIL	Infiltração intralesional de antimoniato de meglumina
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos
KS	Teste de normalidade KS
LVC	Leishmaniose visceral canina
LV	Leishmaniose visceral
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
mL	Mililitro
mm	Milímetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PA	Gel hidrofílico de paramomicina
PCPP	Pesquisas Clínicas e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias
Sb⁵⁺	Antimoniais pentavalentes
SBF	Soro Bovino Fetal
SP	São Paulo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 Ocorrência das leishmanioses.....	16
3.2 Leishmaniose cutânea.....	17
3.3 Medicamentos para o tratamento da leishmaniose cutânea.....	19
3.4 Combinação de medicamentos.....	37
4 METODOLOGIA.....	41
4.1 Parasitos.....	41
4.2 Medicamentos.....	41
4.3 Modelos experimentais.....	41
4.4 Infecção dos animais.....	41
4.5 Ensaios experimentais.....	42
4.5.1 Estudo da formulação do gel hidrofílico de paromomicina.....	42
4.5.2 Estudo de esquemas de tratamento intervalar e em dose única utilizando a anfotericina B lipossomal intraperitoneal em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	44
4.5.3 Estudo de definições de esquemas de tratamento utilizando antimoniato de meglumina por via intralesional em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	45
4.5.4 Estudo de combinação binária entre o gel de paromomicina, anfotericina B lipossomal intraperitoneal e antimoniato de meglumina intralesional em hamsters experimentalmente infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	46
4.6 Avaliação da eficácia dos esquemas terapêuticos.....	47
4.6.1 Eficácia clínica.....	47
4.6.2 Eficácia parasitológica.....	48
4.6.3 Avaliação da toxicidade dos medicamentos.....	48
4.7 Análise dos dados.....	48
5 RESULTADOS.....	49
5.1 Estudo da formulação do gel hidrofílico de paromomicina em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> e camundongos infectados com <i>L. (L.) major</i>	49
5.2 Estudo de esquemas de tratamento intervalar e em dose única utilizando a anfotericina B lipossomal intraperitoneal em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	54
5.3 Estudo de definições de esquemas de tratamento utilizando antimoniato de meglumina por via intralesional em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	58
5.4 Estudo de combinação binária entre o gel de paromomicina, anfotericina B lipossomal intraperitoneal e antimoniato de meglumina intralesional em hamsters experimentalmente infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	62
6 DISCUSSÃO.....	66
6.1 Estudo da formulação do gel hidrofílico de paromomicina em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> e camundongos infectados com <i>L. (L.) major</i>	66
6.2 Estudo de esquemas de tratamento intervalar e em dose única utilizando a anfotericina B lipossomal intraperitoneal em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	68
6.3 Estudo de definições de esquemas de tratamento utilizando antimoniato de meglumina por via intralesional em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	70
6.4 Estudo de combinação binária entre o gel de paromomicina, anfotericina B lipossomal intraperitoneal e antimoniato de meglumina intralesional em hamsters experimentalmente infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	71
7 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXO 1.....	87

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar é uma doença negligenciada que acomete pele e mucosas, com perfil de evolução crônico. As principais medidas de controle incluem o diagnóstico e tratamento adequados da doença, visando reduzir o sofrimento dos pacientes, principalmente pelos desfechos desfavoráveis, tais como as deformidades e os óbitos. No entanto, os medicamentos recomendados para o tratamento desta doença apresentam eficácia insatisfatória, efeitos adversos frequentes e graves, e requerem longos esquemas terapêuticos.

Na busca por alternativas terapêuticas para leishmaniose cutânea, diferentes formulações de paromomicina vêm sendo avaliadas há mais de trinta anos, devido à possibilidade de aplicação tópica, fácil administração e redução de efeitos adversos. No Brasil, uma formulação tópica de gel hidrofílico de paromomicina foi desenvolvida por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e avaliada em ensaios pré-clínicos e clínicos (GONÇALVES et al., 2005; MUSSI et al., 2007; SANTOS et al., 2008; AGUIAR et al. 2009; AGUIAR et al., 2010; de MORAIS-TEIXEIRA et al., 2015). Os resultados satisfatórios obtidos nestes estudos incentivaram a produção nacional desse medicamento e, em 2012, foi firmado acordo de transferência de tecnologia da formulação do gel hidrofílico de paromomicina da UFMG para a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), com transferência realizada para indústria farmacêutica da Fiocruz (Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos).

Atualmente, o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) e a Fiocruz financiam o projeto “Desenvolvimento de inovações terapêuticas e diagnósticas para doenças negligenciadas, de acordo com a Política Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde – Desenvolvimento de formulação de paromomicina-gel para uso tópico”, coordenado pelo grupo de pesquisas **Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias** do Instituto René Rachou/Fiocruz, no qual o presente trabalho se insere. Este projeto tem como objetivo o desenvolvimento industrial do gel hidrofílico de paromomicina e sua avaliação em estudos clínicos fase II e III, com expectativa de que nos próximos anos esta formulação possa ser usada como alternativa no tratamento da leishmaniose cutânea.

Esta dissertação de mestrado apresenta dados inéditos de eficácia pré-clínica do lote experimental do gel hidrofílico de paromomicina formulado por Farmanguinhos-Fiocruz, usado como medicamento único e em combinações binárias com anfotericina B lipossomal em dose única via intraperitoneal ou antimoniato de meglumina por infiltração única via intralesional, para o tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Este estudo não só demonstra a reprodução dos resultados obtidos com a formulação original (UFMG), como aponta os possíveis esquemas terapêuticos de combinações, elegíveis para os futuros ensaios clínicos com a formulação preparada pela Fiocruz.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia pré-clínica de esquemas terapêuticos baseados na combinação entre o gel hidrofílico de paromomicina tópico, anfotericina B lipossomal por via intraperitoneal e antimoniato de meglumina por via intralesional para o tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade do gel hidrofílico de paromomicina em animais experimentalmente infectados com *L. (V.) braziliensis* e com *Leishmania (Leishmania) major*;
- Avaliar diferentes esquemas de tratamento utilizando a anfotericina B lipossomal pela via intraperitoneal em animais infectados com *L. (V.) braziliensis*;
- Avaliar diferentes esquemas de tratamento utilizando antimoniato de meglumina por via intralesional em animais infectados com *L. (V.) braziliensis*;
- Avaliar combinações binárias entre o gel hidrofílico de paromomicina tópico, anfotericina B lipossomal via intraperitoneal e antimoniato de meglumina via intralesional em animais experimentalmente infectados com *L. (V.) braziliensis*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ocorrência das leishmanioses

As leishmanioses afetam principalmente pessoas de baixa renda da África, Ásia e América Latina e estão associadas à desnutrição e ao sistema imunológico debilitado. Dos cerca de 200 países e territórios que relatam casos à Organização Mundial da Saúde (OMS), 97 são endêmicos para as leishmanioses, sendo, 65 endêmicos para leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar, 10 endêmicos apenas para leishmaniose visceral e 22 endêmicos apenas para leishmaniose tegumentar. No ano de 2014, mais de 90% dos novos casos de leishmaniose (visceral e tegumentar) notificados à OMS ocorreram no Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2018).

A organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorram de 600 mil a 1 milhão de novos casos de leishmaniose tegumentar a cada ano no mundo, cerca de 95% desses casos ocorrem nas Américas, na Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Mais de dois terços dos novos casos de leishmaniose tegumentar ocorrem em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria (WHO, 2018).

Nas Américas, leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa ocorrem em 20 países, sendo endêmica em 18 deles. No período de 2001 a 2015, foram reportados à Organização Pan-Americana de Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS), 843.931 casos novos de leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa, com média de 56.262 casos/ano. Em 2015, foi registrado decréscimo de 10% de casos em relação ao ano de 2014. Neste mesmo ano (2015), foram registrados 46.086 casos de leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa em 17 dos 18 países endêmicos, sendo 70% deles no Brasil (19.395), Colômbia (7.459) e Peru (5.459) (PAHO/OMS, 2017). De acordo com dados disponíveis no portal eletrônico do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde - DATASUS, no Brasil, entre 2007-2012, foram notificados 139.649 casos de leishmaniose tegumentar, com média anual de 27.930 casos. Destes, cerca de 131 mil foram considerados casos novos (94%), sendo a forma clínica cutânea predominante em 95% dos casos. Neste mesmo período, foram registrados 94 óbitos (15,7 óbitos/ano) tendo como causa direta a leishmaniose tegumentar (BRASIL, 2017b).

3.2 Leishmaniose cutânea

As leishmanioses constituem um grupo de doenças diferentes entre si, que podem comprometer pele, mucosas e vísceras. São causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, agrupados em dois subgeneros: *Leishmania* e *Viannia*. A *Leishmania* é um parasita heterogênico, possuindo então, hospedeiros vertebrados (humanos, cães e animais silvestres) e hospedeiros invertebrados, os insetos dípteros da subfamília *Phlebotominae*, pertencentes os gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Américas). A transmissão da *Leishmania* ocorre através da picada da fêmea destes insetos, também reconhecidos como seus vetores e comumente chamados de flebotomíneos (LAINSON et al., 1987).

A evolução da doença após a infecção está associada à espécie de leishmânia infectante e aos determinantes de susceptibilidade do hospedeiro. As leishmanioses são classificadas em duas formas clínicas: a leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar.

A forma visceral, também conhecida como calazar, é a mais grave das leishmanioses, podendo ser fatal na ausência de tratamento. Trata-se de uma doença sistêmica cujos principais órgãos acometidos são o baço, fígado, linfonodos e medula óssea (WHO, 2018). Essa forma clínica é causada por espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo *Donovani*, sendo *Leishmania (Leishmania) donovani* presente no Velho Mundo e *Leishmania (Leishmania) infantum* no Velho e no Novo Mundo. Por anos, reconheceu-se a espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* como responsável pela leishmaniose visceral nas Américas, porém, estudos mostraram que esta espécie é geneticamente indistinguível de *Leishmania (L.) infantum* (MAURICIO et al., 1999; DANTAS-TORRES, 2006).

A leishmaniose tegumentar é uma enfermidade polimórfica da pele e das mucosas, com perfil de evolução crônico. São reconhecidas três formas clínicas principais: leishmaniose cutânea - caracterizada por lesões não ulceradas ou ulcerosas, indolores únicas ou múltiplas; leishmaniose mucosa - caracterizada por lesões de vias digestivas ou aéreas superiores e leishmaniose difusa - caracterizada por lesões nodulares não ulceradas, difusas e deformantes. No Velho Mundo *Leishmania (Leishmania) tropica*, *L. (L.) aethiopica* e *Leishmania (L.) major* são as responsáveis pela infecção. Nas Américas, 12 espécies são reconhecidas e dessas, sete já foram identificadas no Brasil: *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (V.)*

naiffi, *Leishmania (V.) lindenberg* e *Leishmania (V.) shawi* com menor ocorrência de casos, identificadas nas regiões Norte e Nordeste e as de maior relevância epidemiológica: *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) guyanensis* (BRASIL, 2017a).

Dentre as três leishmânias de importância nosológica no Brasil, *L. (V.) braziliensis* está amplamente distribuída no país, é a espécie que mais frequentemente causa leishmaniose cutânea e também, a espécie relacionada à forma mucosa. A infecção por *L. (V.) braziliensis* produz variada morbidade, de pequenas lesões cutâneas únicas a lesões múltiplas e desfigurantes, acarretando impacto socioeconômico considerável, devido ao estigma social e psicológico, perda de capacidade produtiva, mutilações e outras incapacidades. Cota e colaboradores (2016) mostraram em um estudo de revisão sistemática que esta espécie possui taxa de cura espontânea de aproximadamente 6% e que estudos clínicos com grupos controle deixados sem tratamento ou tratados com placebo não são éticos.

As principais medidas de controle das leishmanioses incluem controle de reservatórios e vetores, educação em saúde, diagnóstico precoce e tratamento adequado dos pacientes. Em relação ao tratamento da leishmaniose cutânea, o Ministério da Saúde no Brasil recomenda como medicamento de primeira escolha o antimonial pentavalente. Na ausência de resposta satisfatória, situações de toxicidade ou contra-indicação formal é recomendado o uso de anfotericina B lipossomal, desoxicolato de anfotericina B e isetionato de pentamidina (BRASIL, 2017a).

Os medicamentos recomendados para o tratamento da leishmaniose cutânea apresentam eficácia insatisfatória, têm efeitos adversos frequentes e graves e requerem longos esquemas de tratamento. Dessa forma, a busca por novas alternativas de tratamento para a leishmaniose cutânea é uma prioridade destacada pelas organizações internacionais e pelo Ministério da Saúde do Brasil.

3.3 Medicamentos para o tratamento da leishmaniose cutânea

Antimoniais Pentavalentes

Os compostos antimoniais, sob a forma de sais trivalentes, foram usados pela primeira vez no tratamento da leishmaniose cutânea em 1912 por Gaspar Vianna, logo após o reconhecimento, em 1904, que os protozoários do gênero *Leishmania* eram os agentes causadores das leishmanioses (BERMAN et al., 1988). Existem duas diferentes formulações de antimoniais pentavalente (Sb^{+5}) disponíveis comercialmente, o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio. Apenas o antimoniato de meglumina, (Glucantime[®] - 81 mg/mL - Sanofi-aventis/Brasil) é comercializado no Brasil.

O antimoniato de meglumina é o medicamento de primeira escolha no tratamento da leishmaniose cutânea no Brasil. É recomendado para pacientes de todas as regiões brasileiras, exceto pacientes com comorbidade renal, hepática ou cardíaca, gestantes e pacientes com idade igual ou maior que 50 anos. Também não é indicado para pacientes provenientes da região Norte do país, onde há ocorrência de *L. (V.) guyanensis*, que não responde bem ao tratamento com o antimoniato de meglumina. O Ministério da Saúde do Brasil recomenda um protocolo de tratamento com doses entre 10 mg e 20 mg Sb^{+5} /kg/dia, sugerindo-se 15 mg Sb^{+5} /kg/dia durante 20 dias por via parenteral. O antimoniato de meglumina é considerado um medicamento altamente tóxico; entre vários efeitos adversos graves, os de maior importância são as alterações cardíacas, hepáticas, pancreáticas e/ou renais (BRASIL, 2017a). Além disso, o uso deste medicamento requer monitoramento ambulatorial constante do paciente, o que exige recursos técnicos e profissionais treinados.

O uso limitado do antimoniato de meglumina para determinados grupos de pacientes e sua elevada toxicidade trazem a necessidade de se avaliar novas apresentações terapêuticas ou diferentes propostas de protocolos. Estudos realizados no Rio de Janeiro propõem a redução da dose do antimoniato de meglumina. Em estudo inicial, realizado em 1997, pequeno número de pacientes (n=23) portadores de leishmaniose cutânea localizada por *L. (V.) braziliensis*, foram aleatoriamente agrupados para receber a dose de 20 mg Sb^{+5} /kg/dia (n=11) ou de 5 mg Sb^{+5} /kg/dia (n=12), ambas por 30 dias consecutivos. A dose baixa apresentou atividade similar à obtida pela dose recomendada pelo Ministério da Saúde, 82 e 83%, de

epitelização completa das lesões ao final do tratamento, respectivamente. Os pacientes foram acompanhados por até sete anos e não houve reativação ou desenvolvimento de lesões mucosas em ambos os grupos durante o acompanhamento (OLIVEIRA-NETO et al., 1997a). Em estudo mais amplo, também realizado no Rio de Janeiro, pacientes portadores de leishmaniose cutânea localizada por *L. (V.) braziliensis* receberam a dose baixa de antimoniato de meglumina, 5 mg Sb⁺⁵/kg/dia por 30 dias consecutivos. Dos 143 pacientes participantes do estudo, 120 (84%) apresentaram cura até o final do tratamento (OLIVEIRA-NETO et al., 1997b).

Enquanto no Rio de Janeiro baixa dose do antimoniato de meglumina (5 mg Sb⁺⁵/kg/dia) se mostrou eficaz no tratamento da leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) braziliensis*, Romero e colaboradores (2001) mostraram a baixa taxa (51%) de cura em pacientes portadores dessa mesma espécie, moradores de Corte de Pedras-BA, tratados com o antimoniato de meglumina na dose de 20 mg/kg/dia durante 20 dias consecutivos. Este mesmo estudo também apontou que o antimoniato de meglumina foi ineficaz em curar pacientes do Amazonas infectados com *L. (V.) guyanensis* (taxa de cura de 26%).

Em termos globais, a taxa de cura com o antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) braziliensis* varia de 71% e 91% (GONZALEZ et al, 2009; REVEIZ et al, 2013). Embora esse medicamento apresente eficácia variável, seus efeitos adversos fazem com que o antimoniato de meglumina esteja longe de ser um tratamento desejável para a leishmaniose cutânea.

Estudo pré-clínico que avaliou isolados clínicos de pacientes mostrou valores de concentração inibitória de 50% (CI₅₀) para o antimoniato de meglumina em ensaio de amastigota intracelular que variaram de 18,5 µg/mL a 59,8 µg/mL para isolados de *L. (V.) braziliensis* e 112,4 µg/mL a 146,0 µg/mL para isolados de *L. (L.) amazonensis* (ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010). Mais recentemente, utilizando modelo *in vitro* com amastigota intracelular, de Morais-Teixeira e colaboradores (2014), avaliaram medicamentos leishmanicidas para isolados de referência de diferentes espécies de leishmânia de importância médica no Brasil. Neste estudo, o antimoniato de meglumina apresentou atividade espécie-dependente para as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* com os respectivos valores de CI₅₀: 40,2 µg/mL, 166,3 µg/mL e 172,4 µg/mL. Apesar dos autores dos estudos

citados adotarem diferentes protocolos de avaliação e diferentes isolados de leishmânias, os valores das CI_{50} foram próximos para as espécies causadoras da leishmaniose cutânea no Brasil.

Em avaliação experimental *in vivo* em modelo animal infectado com *L. (V.) braziliensis*, o antimoniato de meglumina foi avaliado em estudo de dose resposta, mostrando eficácia clínica em doses elevadas (100 e 200 mg/kg/dia - durante 20 dias consecutivos) a partir de 14 dias do início do tratamento (de MORAIS-TEIXEIRA et al., 2015).

Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico poliênico produzido por diferentes espécies de *Streptomyces*. A atividade leishmanicida foi pela primeira vez demonstrada na década de 50, e este fármaco passou a ser utilizado para o tratamento das leishmanioses (DONOVICK et al., 1956; SAHA et al., 1968). É formulada em suspensão coloidal de desoxicolato sódico liofilizado de anfotericina B e comercializada no Brasil como Anforicin B[®] (50 mg - Cristália/Brasil).

O Ministério da Saúde do Brasil indica o uso do desoxicolato de anfotericina B como medicamento de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose cutânea, recomendada em situação de toxicidade ou refratariedade ao tratamento com o antimonial. A dose preconizada é 0,5 a 1,0 mg/kg/dia, com dose total de 25 a 40 mg/kg, administrada por via endovenosa por quatro a seis horas, solubilizada em solução glicosilada 5%. O tratamento requer hospitalização e é contraindicada para pacientes com insuficiência renal. Dentre seus efeitos adversos, o comprometimento da função renal é considerado o mais grave (BRASIL, 2017a).

No velho Mundo, camundongos Balb/C infectados com *L. (L.) major* foram tratados com diferentes formulações de anfotericina B (Fungizone[®], Albecet[®], AmBisome[®] e Amphocil[®]) em doses que variaram de 1 mg/kg a 25 mg/kg durante seis dias. O resultado deste estudo mostrou que somente o AmBisome[®] e o Amphocil[®] levaram à redução no tamanho da lesão (YARDLEY; CROFT, 2000).

No Brasil, o desoxicolato de anfotericina B foi avaliado em ensaio de amastigota intracelular para diferentes espécies de leishmânias, sendo obtidos os seguintes valores de CI_{50} : 0,04 $\mu\text{g/mL}$ para *L. (V.) braziliensis*, 0,07 $\mu\text{g/mL}$ para *L. (L.) amazonensis* e 0,04 $\mu\text{g/mL}$ para *L. (L.) infantum chagasi*. Nesse estudo não foi observada toxicidade das doses avaliadas para macrófagos murinos baseado na observação morfológicas dessas células (de MORAIS-TEIXEIRA et al., 2014).

Em ensaio avaliando a combinação entre o tamoxifeno e o desoxicolato de anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) amazonensis*, o grupo tratado com anfotericina B em monoterapia na dose de 4 mg/kg/dia (20 doses) foi eficaz em reduzir tamanho das lesões e carga parasitária local. A menor dose avaliada 1,2 mg/kg/dia não foi eficaz (TRINCONI et al., 2014).

Em ensaio multicêntrico realizado no Brasil com portadores de leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) guyanensis*, que previa comparar a eficácia e a tolerância do antimoniato de meglumina, isotionato de pentamidina e desoxicolato de anfotericina B, este último braço foi descontinuado pela recusa dos pacientes ao tratamento, devido à elevada toxicidade (NEVES et al., 2011). Outro exemplo da toxicidade do desoxicolato de anfotericina B em que houve descontinuidade do braço devido à toxicidade aconteceu no ensaio clínico LV Brasil. Este estudo foi realizado para avaliar a eficácia e segurança do desoxicolato de anfotericina B, anfotericina B lipossomal e a combinação de dose única de a anfotericina B lipossomal com antimoniato de meglumina em comparação ao protocolo padrão do antimoniato de meglumina para o tratamento de pacientes portadores de leishmaniose visceral (ROMERO et al., 2017).

No final da década de 90, novas formulações lipídicas de anfotericina B foram desenvolvidas visando minimizar os efeitos adversos causados pelo desoxicolato de anfotericina B. Nestas formulações, a anfotericina B foi incorporada em lipossomas, levando a menor exposição do fármaco livre nos órgãos, o que tornou essas formulações alternativas atraentes quando comparadas à formulação convencional (desoxicolato de anfotericina B), uma vez que apresentam maior afinidade pelas células do sistema fagocítico mononuclear, tendendo a se acumular nos vacúolos parasitóforos das células do parasitadas.

Um dos primeiros estudos experimentais avaliando as formulações lipídicas de anfotericina B foi realizado no tratamento da leishmaniose visceral em camundongos Balb/C infectados com *L. (L.) donovani*. Houve queda significativa de parasitas no baço e fígado para todos os tratamentos, sendo que a eficiência global do Amphocil[®] foi igual à do AmBisome[®], que foi maior do que a do Abelcet[®], que por sua vez foi maior que a do Fungizone[®] (MULLEM et al., 1997). Yardley e Croft (2000) avaliaram essas mesmas formulações em animais infectados com *L. (L.) donovani* e *L. (L.) major*. Para a espécie viscerotrópica, todas as formulações avaliadas foram ativas. Fungizone[®], AmBisome[®] e Amphocil[®] tiveram efeito similar e Abelcet[®] significativamente diferente do AmBisome[®]. Para a espécie dermatotrópica, AmBisome[®] e Amphocil[®] reduziram o tamanho da lesão em 40% e 30%, respectivamente quando comparados com o grupo controle e não houve recidiva de lesões. Fungizone[®] e Abelcet[®] não foram ativos em camundongos Balb/C infectados com *L. (L.) major*.

No Brasil, o AmBisome[®] é a formulação lipídica utilizada para o tratamento das leishmanioses, recomendado o seu uso como medicamento de primeira escolha para pacientes com 50 anos ou mais, pacientes com insuficiência renal, cardíaca ou hepática de qualquer idade, pacientes transplantados renais, cardíacos ou hepáticos e gestantes de qualquer idade. O medicamento se apresenta em frasco/ampola contendo 50 mg de anfotericina B lipossomal liofilizada que é reconstituída em 12 mL de água destilada de injeção; essa solução passa a ter 4 mg/mL do fármaco. A dose preconizada é de 2 a 5 mg/kg/dia, até atingir a dose máxima de 25 a 40 mg/kg, por via endovenosa. Febre e tremores ou calafrios são os efeitos adversos mais comuns com a infusão do medicamento (BRASIL, 2017a). O tratamento com este medicamento, assim como com o desoxicolato de anfotericina B exige a internação do paciente, o que agrega maior custo ao tratamento.

No Brasil, a anfotericina B lipossomal está registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para uso no tratamento da leishmaniose visceral. Não existe registro para uso em leishmaniose tegumentar. Embora a indicação da anfotericina B lipossomal para o tratamento da leishmaniose cutânea tenha fundamento por experiências isoladas e relatos de casos, ela é pouco documentada por ensaios clínicos controlados, havendo dessa forma, necessidade de avaliações que subsidiem o amplo uso da anfotericina B lipossomal no tratamento desta forma da doença.

Dois estudos independentes avaliaram a anfotericina B lipossomal em pacientes que visitaram a Bolívia (n = 7) ou residiam neste país (n = 34 - estudo prospectivo observacional, não cego) portadores de leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) braziliensis*. Em ambos estudos, os pacientes foram tratados com 3 mg/kg/dia via endovenosa, durante cinco dias consecutivos e receberam a sexta dose no 10º dia. Dos sete pacientes que visitaram a Bolívia, cinco haviam falhado na resposta ao tratamento com o estibogluconato de sódio e 100% responderam ao tratamento com a anfotericina B lipossomal em menos de um mês, com efeitos colaterais brandos. O seguimento pós tratamento por 12 meses não revelou recidivas (SOLOMOM et al., 2007). Dos pacientes bolivianos tratados com a anfotericina B lipossomal, 85% foram curados **versus** 70% que foram tratados com o estibogluconato de sódio. A taxa de falha terapêutica foi de 3% para o tratamento com a anfotericina B lipossomal e de 25% para o tratamento com o estibogluconato de sódio. O tratamento com antimônio foi interrompido em 65% dos pacientes devido a efeitos adversos, não tendo havido nenhuma interrupção de tratamento entre os pacientes tratados com a anfotericina B (SOLOMOM et al., 2013).

A eficácia da anfotericina B lipossomal foi avaliada em pequeno número de pacientes (n=19) portadores de leishmaniose cutânea causada por diferentes espécies: *Leishmania* (*L. (L.) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis*) e 84% tiveram cura com o tratamento inicial de anfotericina B lipossomal no esquema de 3 mg/kg/dia em 10 doses, durante 21 dias. A toxicidade renal moderada ocorreu em 45% dos pacientes (WOTMANN et al., 2010).

No Brasil, estudo retrospectivo foi realizado em São Paulo, com apenas oito pacientes diagnosticados com leishmaniose mucosa e com contraindicação ao antimoniato de meglumina. Os pacientes foram tratados com doses de 3 a 5 mg/kg/dia de anfotericina B lipossomal, por 14 a 40 dias. Todos os pacientes apresentaram cura clínica (AMATO et al., 2011). Outro estudo utilizado a anfotericina B lipossomal foi realizado também em São Paulo com 16 pacientes portadores de leishmaniose mucosa e contraindicação ao antimoniato de meglumina, pentamidina e desoxicolado de anfotericina B. Os pacientes receberam doses de anfotericina B lipossomal que variaram de 1,2 a 4,5 mg/kg/dia, por 4 a 40 dias. A taxa de cura foi de 88% (ROCIO et al., 2014).

Em mais um estudo retrospectivo realizado em São Paulo, a anfotericina B lipossomal foi avaliada em 29 pacientes portadores de leishmaniose mucosa, possivelmente causada por *L. (V.) braziliensis*, com contraindicação ao antimoniato de meglumina e ao desoxicolado de anfotericina B. A dose acumulada administrada foi de 32,5 mg/kg. A cura completa foi obtida em 93% dos pacientes (CUNHA et al., 2015).

Em Brasília-DF, foi desenvolvido um estudo piloto com o intuito de identificar a menor dose de anfotericina B lipossomal que promovesse percentual de cura clínica semelhante ao antimoniato de meglumina. Pacientes portadores de leishmaniose cutânea foram agrupados aleatoriamente em dois braços de estudo clínico: anfotericina B lipossomal (n=16) na dose de 1,5 mg/kg/dia, por 5 dias e antimoniato de meglumina (n=19) na dose de 20 mg/kg/dia, por 20 dias. O grupo de pacientes tratados com anfotericina B lipossomal apresentou 50% de cura e o grupo de pacientes que recebeu o antimoniato de meglumina apresentou 100% de cura. No entanto, os pacientes desse último grupo apresentaram mais efeitos adversos do que os pacientes do grupo tratado com a anfotericina B lipossomal (MOTA; SAMPAIO, 2012).

Em Corte de Pedra-BA, 20 pacientes foram tratados com anfotericina B lipossomal em doses totais que variaram de 17 a 37 mg/kg, por período de sete a 14 dias. A cura clínica foi obtida em 70% dos pacientes, contudo, no quarto mês após o fim do tratamento, um paciente apresentou recidiva e o percentual de cura passou a ser de 65% (MACHADO et al., 2015).

Apesar dos ensaios clínicos realizados no Brasil avaliarem a anfotericina B lipossomal em estudos não controlados e em pequeno número de pacientes, o medicamento parece ter atividade contra as espécies de *Leishmania* que ocorrem no país. Nenhum estudo controlado, randomizado foi realizado no Brasil, havendo, portanto, a necessidade de realização desse tipo de estudo.

Isotionato de Pentamidina

A pentamidina, uma diamidina aromática, com potencial antimicrobiano, foi sintetizada como fármaco hipogliceminante e teve sua atividade leishmanicida demonstrada (ROBERT; BRIGGAMAN, 1977; BALAÑA-FOUCE et al., 1998).

É apresentada como isotionato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) de pentamidina em ampola contendo 300 mg do sal. O Ministério da Saúde do Brasil preconiza seu uso como medicamento de primeira escolha para o tratamento de leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) guyanensis* e como medicamento de segunda escolha para as demais formas clínicas de leishmaniose tegumentar. A pentamidina não é recomendada para pacientes com comorbidade renal, hepática ou cardíaca, diabéticos, gestantes, lactantes e crianças menores de um ano. O protocolo de tratamento varia de três a dez doses de 3 a 4 mg/kg/dia, em dias alternados e pode ser realizado por via intramuscular ou endovenosa (BRASIL, 2017a).

O principal medicamento utilizado no tratamento das leishmanioses no Brasil, o antimoniato de meglumina, se mostrou ineficaz no tratamento de pacientes com leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) guyanensis* em quatro municípios do Estado do Amazonas. A taxa de cura com este medicamento foi de 26% (ROMERO et al., 2001). Entretanto, atividade maior com o tratamento com pentamidina foi observada em um ensaio clínico multicêntrico envolvendo pacientes de Manaus-AM, Brasília-DF, Corte de Pedra-BA e Ribeirão Preto-SP, em um estudo que comparou a eficácia e a tolerância do antimoniato de meglumina, isotionato de pentamidina e desoxicolato de anfotericina B no tratamento de pacientes portadores de leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) guyanensis*. Em Manaus, 185 pacientes participaram do estudo e foram agrupados aleatoriamente em três braços: antimoniato de meglumina (n=74) administrado em dose de 15 Sb⁺⁵mg/kg/dia por 20 dias, isotionato de pentamidina (n=74) receberam três doses de 4 mg/kg/dia administrados em 72h, e desoxicolato de anfotericina B (n=37) tratados com 1 mg/kg/dia por 20 dias. Seis meses após o tratamento, a eficácia foi de 58% e 55% para isotionato de pentamidina e antimoniato de meglumina, respectivamente. Vinte e oito pacientes (75%) do grupo de desoxicolato de anfotericina se recusaram a continuar participando do estudo e esse braço foi descontinuado (NEVES et al., 2011).

Outro ensaio clínico realizado em Manaus-AM foi conduzido com pequeno número de pacientes (n=20) portadores de leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) guyanensis*, com o intuito de avaliar a eficácia do uso do isotionato de pentamidina em dose única (7 mg/kg). Cura completa das lesões foi observada em 55% dos pacientes seis meses após o tratamento (GADELHA et al., 2015).

Para outros países da América do Sul (Colômbia, Guiana Francesa, Suriname), as taxas de cura com a pentamidina, avaliada em diferentes protocolos, variaram de 48% a 96% (SOTO et al., 1994; ROBLEDO et al., 2006; ROUSSEL et al., 2006; HU et al., 2015).

Miltefosina

Miltefosina (hexadecilfosfocolina) é uma alquilfosfocolina, desenvolvida originalmente como agente antineoplásico, sendo incorporada em formulações de uso tópico no tratamento de metástases cutâneas do câncer de mama. Na década de 80, sua atividade leishmanicida foi demonstrada contra espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose visceral (HERRMANN et al., 1982; ACHTERBERG et al., 1987; CROFT et al., 1987). Posteriormente, Escobar e colaboradores, (2002) demonstraram a eficácia desse medicamento em estudo *in vitro*, não somente para *L. (L.) donovani*, mas também para espécies causadoras da forma cutânea da doença (*L. (L.) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) mexicana* e *L. (V.) panamensis*) (ESCOBAR et al., 2002). Pacientes do Velho Mundo portadores de leishmaniose cutânea por *L. (L.) major* apresentaram taxa de cura de 93% com o tratamento por miltefosina (MOHEBALI et al., 2007).

Na Colômbia, a eficácia da miltefosina foi avaliada em estudo clínico, fase I/II, aberto. Os pacientes tratados com doses altas (133-150 mg/kg/dia) apresentaram taxa de cura de 94%, enquanto os pacientes tratados com doses menores (50-100 mg/kg/dia) apresentaram menor taxa de cura (66%) (SOTO et al., 2001). Ainda na Colômbia, onde *L. (L.) panamensis* é a principal espécie prevalente, o esquema de 2,5 mg/kg/dia por 28 dias resultou em taxa de cura de 91%, comparada com 38% no grupo placebo. Já na Guatemala, onde predominam *L. (L.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana*, foram encontradas taxas de cura de 53% no grupo tratado e 21% no grupo placebo (SOTO et al., 2004). Entretanto, em pacientes colombianos, maiores taxas de cura, de 85%, 88% e 82% foram obtidas, respectivamente, após 2, 4 e 6 meses do tratamento da leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) braziliensis* (SOTO; BERMAN, 2006).

Na Bolívia, a eficácia da miltefosina na dose de 2,5 mg/kg/dia, por 28 dias, foi comparada à do antimônio, na dose de 20 mg Sb⁺⁵/kg/dia, por 20 dias, no tratamento da leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) braziliensis* em pacientes maiores de 12 anos. A taxa de cura foi

de 88% para os pacientes tratados com miltefosina e 94% para aqueles tratados com antimoniato de meglumina, após seis meses de seguimento (SOTO et al., 2008).

Vélez e colaboradores (2010) conduziram um ensaio clínico randomizado na Colômbia. Um grupo de pacientes recebeu miltefosina em cápsulas de 50 mg, três vezes ao dia, por 28 dias (dose diária máxima de 150 mg e dose total por paciente de 4.200 mg) e apresentou eficácia de 70% na análise “por protocolo” e de 59% na análise por “intenção de tratar”. Outro grupo de pacientes tratados com antimoniato de meglumina, na dose de 20mg Sb⁺⁵/kg/dia, por 20 dias, apresentou eficácia de 85%, “por protocolo”, e de 72%, pela “intenção de tratar” (VÉLEZ et al.,2010).

Dois outros estudos clínicos avaliaram a eficácia da miltefosina em crianças, na Colômbia. No primeiro, um estudo randomizado, fase III, aberto, foi conduzido em três localidades onde *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis* são prevalentes. A taxa de cura pela análise “ por intenção de tratar” foi de 83% (1,8 mg a 2,5 mg/kg/dia, durante 28 dias). Neste mesmo estudo, o antimoniato de meglumina (20 mg/kg/dia, por 20 dias) foi administrado a outro grupo de pacientes, como controle de tratamento, e a taxa de cura, pela mesma análise, foi de 69% (RUBIANO et al., 2017). O segundo estudo clínico de fase IV aberto foi conduzido com a finalidade de determinar a farmacocinética da miltefosina administrada em 30 crianças e 30 adultos com leishmaniose cutânea na dose de 1,8 a 2,5 mg/kg/dia durante 28 dias. A cura definitiva (6 meses após o término do tratamento) foi alcançada em 100% dos adultos (28/28) e em 83% das crianças (24/29). Apesar da maior frequência de falha terapêutica em crianças, essa diferença não foi estatisticamente significativa. A análise demonstrou que as concentrações plasmáticas e intracelulares de miltefosina, curva-concentração tempo e concentração máxima, foi significativamente menor em crianças, o que indica uma possível necessidade de tratamento diferenciado para essas populações (CASTRO et al., 2017).

A miltefosina foi investigada em estudos realizados na Bolívia e Argentina para o tratamento da leishmaniose mucosa. Pacientes bolivianos, portadores de leishmaniose mucosa foram tratados com dose de 2,5 mg/kg/dia, por 4 semanas apresentaram taxa de cura de 71% em seguimento de 12 meses (SOTO et al., 2009). Na Argentina, os pacientes foram agrupados em dois braços, os tratados com miltefosina (n=8) nas doses de 2,5 a 3,3 mg/kg/dia (dose máxima 150 mg/dia), durante 28 a 35 dias e, os tratados com antimoniato de meglumina (n=10), na

dose de 10 a 20 mg Sb⁺⁵/kg/dia (dose máxima de 850 mg/dia), durante 28 a 35 dias. A taxa de cura foi de 63% e a melhora clínica foi de 88% para o grupo de pacientes tratados com miltefosina, sendo que apenas um paciente apresentou falha terapêutica. Para o grupo tratado com o antimoniato de meglumina, a taxa de cura foi de 50% e a melhora clínica foi de 80%. Com o pequeno número de pacientes avaliados, não houve diferença estatística significativa entre o tratamento da miltefosina e do antimoniato de meglumina (GARCIA-BUSTOS et al., 2014a).

No Brasil, a miltefosina não possui registro e não é comercializada para o tratamento de leishmaniose cutânea. Em novembro de 2016, a CONITEC (Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS) divulgou um relatório de recomendação do uso da miltefosina no tratamento da leishmaniose tegumentar (BRASIL, 2016). No entanto, o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar publicado no início do ano de 2017, não apresentou nenhuma recomendação para o uso da miltefosina no tratamento da leishmaniose cutânea (BRASIL, 2017a). Em 2016, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), autorizou o uso da miltefosina (Milteforan[®]) para o tratamento de cães infectados com leishmaniose visceral canina sob a seguinte condição:

“Em conformidade com a Nota Técnica Conjunta n° 001/2016 MAPA/MS, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) deferiu o registro do fármaco Miltefosina, utilizado para o tratamento de cães com leishmaniose visceral canina (LVC). Em consonância com a Portaria Interministerial n°1.426 de 11 de julho de 2008, que regulamenta o tratamento de cães, e proíbe o tratamento da leishmaniose visceral (LV) com produtos de uso humano ou não registrados no MAPA, o tratamento de cães com LVC com o referido medicamento passa a ser uma possibilidade legal”.

Em ensaio de amastigota intracelular para as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (L.) donovani*, as espécies do Novo Mundo mostraram sensibilidade ao medicamento com valores de IC₅₀ que variaram de 1,31 µg/mL a 2,20 µg/mL. Outro achado do estudo foi que a miltefosina foi 20 vezes mais ativa para a espécie causadora da leishmaniose visceral do Velho Mundo (0,09 µg/mL) do que para a causadora da leishmaniose visceral no Novo Mundo (1,82 µg/mL) (de MORAIS-TEIXEIRA et al., 2011).

No Brasil, identificou-se estudo registrado no *Clinical Trials* (NCT00378495), iniciado em setembro de 2006 e finalizado em outubro de 2007, que avaliou o tratamento com mitefosina

(2,5 mg/kg/dia x 28 dias) em pacientes (adultos e crianças) com leishmaniose visceral (CLINICAL TRIALS, 2018). Os resultados deste estudo não foram disponibilizados, mas sabe-se que a miltefosina não foi eficaz no controle da doença com o protocolo de tratamento adotado, curando apenas 42% dos pacientes tratados por 28 dias e 67% dos pacientes tratados por 42 dias (informação verbal Reynaldo Dietze, Universidade Federal do Espírito Santo: Núcleo de Doenças Infecciosas). Outro estudo, de análise proteômica avaliando isolados de *L. (L.) infantum chagasi* isoladas de pacientes que foram tratados com a miltefosina, identificou que diferentes proteínas de expressão estão possivelmente envolvidas na resistência natural ao medicamento no Brasil (CARNIELLI et al., 2014).

A miltefosina foi avaliada em ensaio de dose resposta em animais experimentalmente infectados com *L. (L.) amazonensis* nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia durante 5 dias no período de duas semanas. Somente a maior dose avaliada foi eficaz em reduzir parasitas viáveis na lesão (AGUIAR et al., 2010). Em outro estudo experimental *in vivo*, a eficácia da miltefosina também foi avaliada em animais infectados *L. (L.) amazonensis*. Camundongos infectados foram tratados em diferentes tempos (a partir do 5º ou 40º dias após a infecção) com 16 mg/kg/dia de miltefosina ou 100 Sb⁺⁵ mg/kg/dia de antimoniato de meglumina. A miltefosina foi mais eficaz do que o antimoniato de meglumina em diminuir o tamanho das lesões e em reduzir a carga parasitária local (lesão), no baço e no fígado (GARCIA-BUSTOS et al., 2014b). Em outro estudo, animais infectados com *L. (L.) amazonensis* foram tratados com miltefosina (200 mg/kg/dia) em monoterapia e com a combinação de miltefosina (200 mg/kg/dia) e pentoxifilina (8 mg/kg/dia) durante 12 dias. Na avaliação de redução do tamanho da lesão, a miltefosina em monoterapia foi tão eficaz quanto a combinação de miltefosina e pentoxifilina (SANTAREM et al., 2014).

Coelho e colaboradores (2014) avaliaram a miltefosina em ensaios *in vitro* e *in vivo*, em dois isolados de *L. (L.) amazonensis*: isolado referência e isolado de paciente portador de leishmaniose cutânea difusa. Os resultados *in vitro* mostraram que o isolado de paciente foi menos susceptível à miltefosina do que o isolado referência. Na avaliação *in vivo*, a miltefosina (13 mg/kg/dia durante 15 consecutivos) foi eficaz no tratamento de camundongos Balb/C infectados com os dois isolados. De acordo com os autores, esses dados mostram a dificuldade em estabelecer correlação entre a susceptibilidade *in vitro* e a resposta ao

tratamento *in vivo*, mas que o estudo também foi importante para evidenciar a eficácia leishmanicida da miltefosina para *L. (L.) amazonensis*.

Em Corte de Pedra-BA, a atividade e a segurança da miltefosina foram avaliadas em 90 pacientes com leishmaniose cutânea caudada por *L. (V.) braziliensis* em comparação ao tratamento padrão com o antimoniato de meglumina. Os pacientes foram agrupados em dois braços: miltefosina (n=60) administrada na dose de 2,5 mg/kg/dia, por 28 dias e antimoniato de meglumina (n=30) administrado na dose de 20 mg/kg/dia, por 20 dias. Seis meses após o fim do tratamento, a taxa de cura foi de 75% para o grupo tratado com a miltefosina e 53% para o grupo tratado com o antimônio. A incidência de eventos adversos foi semelhante para os dois grupos de tratamento (MACHADO et al., 2010).

A eficácia da miltefosina não foi tão satisfatória em estudo pré-clínico quanto o estudo clínico citado anteriormente para leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) braziliensis*. No curso de um estudo experimental, para definição da dose a ser usada em combinação com outros medicamentos leishmanicidas, a miltefosina foi avaliada em ensaio de dose resposta nas doses de 5, 10 ou 25 mg/kg/dia em 10 dias alternados por 20 dias em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*. Na resposta clínica, nenhuma das doses avaliadas levou a redução significativa do tamanho das lesões. Quanto à avaliação parasitológica, não houve redução do número de parasitas no local da infecção (lesão) em animais tratados com miltefosina a 5, 10 ou 25 mg/kg/dia em comparação com o grupo controle. No entanto, a dose de 25 mg/kg/dia foi eficaz em reduzir o número de parasitas no baço dos animais quando comparado com o grupo controle sem tratamento (de MORAIS-TEIXEIRA et al., 2015).

Em Manaus-AM, a eficácia da miltefosina foi avaliada em pacientes portadores de leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) guyanensis*. Os pacientes foram divididos em dois grupos: miltefosina (n=60) administrada na dose de 2,5 mg/kg/dia, por 28 dias e antimoniato de meglumina (n=30) administrado em dose de 15 a 20 mg/kg/dia, por 20 dias. As taxas de cura foram de 71% para o grupo tratado com miltefosina e 54% para o grupo tratado com antimônio. Os efeitos adversos da miltefosina mais frequentes foram vômito, náuseas e diarreia (CHRUSCIAK-TALHARI et al., 2011). Outros ensaios clínicos estão atualmente em andamento no Brasil (Brasília-DF - NCT 01377974 e Bahia - NCT 02530697) para a avaliação da miltefosina em fase de recrutamento de pacientes (CLINICAL TRIALS, 2018).

De modo geral, os ensaios clínicos e pré-clínicos realizados no Brasil mostraram a eficácia da miltefosina no tratamento da leishmaniose cutânea.

Antimonial Pentavalente Intralesional

O uso do antimoniato de meglumina, Glucantime[®] administrado por via intralesional foi recentemente introduzido nas recomendações do Ministério da Saúde do Brasil, como o esquema de primeira escolha, para o tratamento da leishmaniose cutânea localizada, com lesão única de até 3 cm no seu maior diâmetro. O protocolo de tratamento é de uma a três aplicações de aproximadamente 5 mL por sessão, com o intervalo entre as aplicações de 15 dias (BRASIL, 2017a). Essa abordagem terapêutica se destaca pela via de aplicação local, o que reduz a toxicidade desse tratamento. Além disso, este procedimento não exige investimento em equipamentos ou hospitalização dos pacientes.

A experiência com a infiltração intralesional com o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) ou o estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) vem se acumulando há décadas no Velho Mundo e nas Américas. Recentemente (2017), a eficácia da infiltração intralesional com antimonias pentavalentes para o tratamento da leishmaniose cutânea foi demonstrada em trabalho de revisão sistemática, no qual 40 estudos globais foram avaliados. No Velho Mundo, os ensaios clínicos aconteceram em 12 países (Afeganistão, Irã, Turquia, Sri Lanka, Israel, Índia, Líbia, Marrocos, Tunísia, Arábia Saudita, Emirados Árabes e Síria) e a eficácia global foi de 75%. As taxas de cura foram significativamente maiores com uso do estibogluconato de sódio na infiltração intralesional (83%), em relação ao antimoniato de meglumina (68%). No Novo Mundo, estudos foram realizados na Bolívia, Brasil e Venezuela e mostraram eficácia global de 77%. Desses, em seis estudos o antimoniato de meglumina apresentou eficácia de 82% e em outros dois estudos o estibogluconato de sódio apresentou eficácia de 61%. O antimoniato de meglumina foi significativamente mais eficaz do que o estibogluconato de sódio na terapia intralesional nas Américas; o contrario ocorreu no Velho Mundo (BRITO, COTA E RABELLO, 2017)

No Brasil, Gadelha e colaboradores (1990), avaliaram injeções intralesionais de antimoniato de meglumina no tratamento de pacientes (n=60) portadores de leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) guyanensis*. A cura clínica foi observada em 94% dos casos, tratados com três a

dez aplicações semanais de 0,5 a 10 mL por lesão. Os autores destacaram a eficácia deste método, que pode ser empregado em gestantes a partir do 3º mês, em pacientes com insuficiência renal, hepática ou cardíaca, ou outra situação onde exista contraindicações a medicamentos de uso sistêmico.

Em outro estudo realizado na década de 90, no Rio de Janeiro - Brasil, o antimoniato de meglumina intralesional foi avaliado em pacientes (n=74) portadores de leishmanioses cutânea localizada causada por *L. (V.) brasiliensis*. O protocolo de tratamento foi realizado em quatro aplicações, seguindo os pontos cardiais, para obter entumescimento completo da lesão e a quantidade de medicamento variou de acordo com o tamanho de cada lesão. Os pacientes foram avaliados 15 dias após a infiltração e caso não houvesse de melhora, outra infiltração era realizada. Após 12 semanas, 80% (59/74) dos pacientes foram curados. Os autores acompanharam os pacientes por 10 anos e não foram observadas recidivas ou desenvolvimento de lesões mucosas (OLIVEIRA-NETO et al., 1997c).

Outro ensaio clínico conduzido no Rio de Janeiro - Brasil, em 24 pacientes que apresentavam contraindicação à medicamentos sistêmicos, a eficácia e a segurança do antimoniato de meglumina intralesional foi avaliada. O protocolo de tratamento consistiu de uma a quatro infiltrações intralesionais, em intervalos de 15 dias. A taxa de cura ao final de 12 meses foi de 83% (20/24). Quatro pacientes precisaram receber tratamento adicional (três com anfotericina B e um com antimoniato de meglumina sistêmico) para que houvesse a cura completa das lesões. O antimoniato de meglumina intralesional não demonstrou toxicidade relevante, único efeito adverso relatado foi dor no local das infiltrações. Em acompanhamento de 60 meses não houve recidivas (VASCONCELHOS et al., 2012).

Silva e colaboradores (2016) realizaram estudo retrospectivo com base em registros clínicos de pacientes atendidos no Centro de Referência em Leishmaniose do Instituto René Rachou/Fiocruz em Belo Horizonte - MG. Foram incluídos na análise, os casos de pacientes (n=31) diagnosticados com leishmaniose cutânea que se submeteram ao tratamento com antimoniato de meglumina intralesional, de janeiro 2008 a dezembro de 2013. Em 22 pacientes (71%), o tratamento com o antimoniato de meglumina intralesional foi indicado devido à presença de contraindicações ao antimoniato de meglumina sistêmico. O tratamento consistiu em uma a seis infiltrações por período de até 12 semanas. A taxa de cura inicial (3

meses) foi de 71% e para cura definitiva de 68% (após seis meses). Desconforto leve durante a infiltração foi relatado pela maioria dos pacientes.

Mais recente, um ensaio clínico, aberto, braço único, fase II/III foi conduzido no Instituto René Rachou/Fiocruz, em Belo Horizonte - MG com o objetivo de avaliar eficácia e segurança do uso do antimoniato de meglumina intralesional no tratamento da leishmaniose cutânea localizada. O protocolo de tratamento desse estudo seguiu metodologia validada por Silva e colaboradores (2017). Os pacientes receberam infiltração intralesional de antimoniato de meglumina com frequência semanal até cicatrização completa da lesão ou o máximo de oito infiltrações. A taxa de cura dos pacientes aos 45 dias foi de 53% e aos 90 dias de 87% (RAMALHO, 2017).

Paromomicina

A paromomicina é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, isolado pela primeira vez em 1956, sendo produzido pelo *Streptomyces rimosus*, subespécie *paromomycinus* (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2008). É comercializada em duas apresentações o Paramomycin[®], (Gland Pharma Ltd, Índia) e o Leshcutan[®] (Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Israel).

A paromomicina tem sido avaliada para o tratamento da leishmaniose cutânea, principalmente no Velho Mundo, e sua possibilidade de aplicação tópica é considerada ideal pela facilidade de administração e baixa frequência de efeitos adversos. (BERMAN., 2005; CARNEIRO et al., 2012). Os primeiros estudos que avaliaram a atividade da paromomicina em *Leishmania* spp. foram conduzidos na década de 1960 (NEAL et al., 1968) para a espécie *L. (L.) tropica*, com resultados promissores. Na década de 80, foram realizados novos estudos *in vitro* e *in vivo*. Entre os resultados, destaca-se a eficácia de uma pomada contendo 15% de paromomicina + 12% de cloreto de metil-benzetônio para infecções por *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana* (EL-ON; GREENBLATT 1983; EL-ON et al., 1984; EL-ON; JACOBS; WEINRAUCH, 1988; CARTER; ALEXANDER et al., 1989).

Em 1994, Neal e colaboradores avaliaram a atividade *in vivo* de uma nova associação de paromomicina (15%) com uréia (10%). A substituição do cloreto de metil-benzetônio por

ureia se deu pela ocorrência de reação inflamatória e desconforto, relatados nos estudos anteriores. O resultado da nova associação foi eficaz e não irritante em animais infectados com *L. (L.) major* (NEAL et al., 1994). Em outro estudo, a eficácia da associação paromomicina (15%) /gentamicina (0,5%) foi maior do que a apresentada por paromomicina (15%) /cloreto de metil-benzetônio (12%). Essa nova proposta de formulação foi capaz de promover e curar 100% dos animais infectados com *L. (L.) major* e mantê-los sem recidivas por 70 dias (GROL et al., 1999).

Os primeiros estudos clínicos que avaliaram formulações tópicas de paromomicina foram realizados no Velho Mundo. Um estudo randomizado, duplo-cego com 39 pacientes portadores de leishmaniose cutânea causada por *L. (L.) major* foi conduzido para avaliar uma pomada de paromomicina (15%) e cloreto de metil-benzetônio (12 ou 15%). Os pacientes foram tratados duas vezes ao dia, durante 10 ou 20 dias. A taxa de cura foi de 74%, no entanto, o cloreto de metil-benzetônio causava reações locais como inflamação, sensação de queimação e dor no local da aplicação. Assim, outra formulação foi desenvolvida e o cloreto de metil-benzetônio foi substituído por ureia (10%). Vinte e sete pacientes receberam o tratamento por 12 semanas e a taxa de cura foi de 85% (EL-ON et al., 1992; BRYCESON et al., 1994).

No Novo Mundo, a pomada de paromomicina (15%) e cloreto de metil-benzetônio (12%) foi avaliada em Belize, onde as espécies causadoras de leishmaniose cutânea mais comuns são *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana*. Foram tratados 53 pacientes, por 14 a 21 dias, com taxa de cura de 74% (WEINRAUCH et al., 1993). Esta mesma formulação, quando avaliada no Equador em 52 pacientes, mostrou taxa de cura de 72% após 50 dias, 90% após 100 dias e 9% dos pacientes apresentaram cura espontânea, após 50 dias (KRAUSE et al., 1994). Na Guatemala, a pomada de paromomicina (15%) e cloreto de metil-benzetônio (12%) foi aplicada duas vezes ao dia por 20 dias em 35 pacientes possivelmente infectados com *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) mexicana*. A taxa de cura, foi de 86%, após 12 meses (ARANA et al., 2001).

Mais recentemente, a formulação WR 279.396, desenvolvida pelo Centro Médico Militar Walter Reed, Estados Unidos da América (Walter Reed National Military Medical Center) sendo estudada em ensaios clínicos de fase II e III no Velho Mundo e na América Latina.

Trata-se de um creme para tratamento tópico da leishmaniose cutânea, contendo 15% de paromomicina e 0,5% de gentamina. Na análise por “intenção de tratar” em um dos estudos, 94% dos pacientes do Velho Mundo tiveram cura clínica completa. Em outros locais, a taxa de cura variou de 87% (Panamá) a 81% (Tunísia) (BEM SALAH et al., 2009; RAVIS et al., 2013; NÉSTOR et al., 2013; BEM SALAH et al., 2013).

No Brasil, uma formulação tópica hidrofílica, composta por gel de hidroxietilcelulose contendo paromomicina (10%) desenvolvida por pesquisadores da UFMG foi efetiva no tratamento de camundongos infectados com *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis* e hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* (AGUIAR et al., 2010; AGUIAR et al. 2009; MUSSI et al., 2007; GONÇALVES et al., 2005). Essa formulação foi também avaliada em ensaio clínico aberto não controlado, o único no país, em poucos pacientes possivelmente infectados com *L. (V.) braziliensis* e que apresentaram contraindicação ao tratamento com antimônio pentavalente. Este estudo ocorreu em Corte de Pedras, na Bahia, onde a resposta ao tratamento sistêmico com antimoniato de meglumina é de 51% (ROMERO et al., 2001). Dos 14 pacientes que chegaram ao final do estudo, a taxa de cura completa com 20 dias de aplicação foi de 21% (3/14) e a de melhora clínica foi de 50% (7/14). Entretanto, prolongando-se o tratamento os resultados foram satisfatórios, com 72% de cura (SANTOS et al., 2008).

Os resultados promissores obtidos nos ensaios pré-clínicos e clínico do gel hidrofílico de paromomicina encorajaram a produção nacional desse medicamento. Em 2012, foi firmado um acordo de transferência de tecnologia da formulação do gel hidrofílico de paromomicina entre a UFMG e indústria farmacêutica da Fiocruz (Farmanguinhos). Atualmente, está em andamento, um projeto financiado pelo Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) e Fiocruz, que tem como objetivo o desenvolvimento industrial do gel hidrofílico de paromomicina e sua avaliação em estudos clínicos fase II e III. A previsão é que nos próximos anos, a formulação para uso tópico de paromomicina possa ser produzida por Farmanguinhos-Fiocruz e compor o arsenal terapêutico da leishmaniose cutânea.

3.4 Combinação de medicamentos

A prática da combinação de medicamentos pode contribuir para aumentar eficácia, reduzir a frequência de efeitos adversos e evitar e/ou adiar o surgimento de resistência. Essas interações medicamentosas são empregadas com sucesso para o tratamento de doenças infecto-parasitárias, como por exemplo, para a malária, tuberculose e AIDS (GRIENSVEN et al., 2010). Para as leishmanioses, estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* realizados com espécies causadoras de leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea têm demonstrado vantagens da combinação de fármacos e sugerido esta estratégia para a terapêutica clínica dessas doenças (SEIFERT; CROFT, 2006; AGUIAR et al., 2009; AGUIAR et al., 2010; SEIFERT et al., 2011; MESQUITA; TEMPONE, REIMÃO, 2014; de MORAIS-TEIXEIRA et al., 2014; TRINCONI et al., 2014; de MORAIS-TEIXEIRA et al., 2015; TRINCONI et al., 2016).

Ensaio clínico também já avaliaram a combinação de medicamentos para o tratamento da leishmaniose cutânea. No Velho Mundo, mais precisamente no Irã, onde *L. (L.) major* é prevalente, em estudo clínico, randomizado, controlado, a combinação do antimoniato de meglumina (20 mg/kg/dia) com pentoxifilina foi avaliada em 64 pacientes. Cura completa foi registrada em 81% dos pacientes tratados com a combinação e 52% para os pacientes tratados com o medicamento controle (antimoniato de meglumina), com diferença estatisticamente significativa. Não foi registrado efeito adverso no tratamento com a pentoxifilina (SADEGHIAN et al., 2006).

No Brasil, estudos que avaliaram a paromomicina combinada com medicamentos leishmanicidas têm demonstrado resultados promissores em modelos animais. Os primeiros estudos de combinação avaliaram o gel hidrofílico de paromomicina a 10% formulado pela UFMG (aplicado duas vezes ao dia durante 10 dias) com miltefosina (10 mg/kg/dia durante 10 dias) oral em animais infectados com *L. (L.) amazonensis*. Essa combinação reduziu significativamente o tamanho da lesão e a carga parasitária na pele e baço dos animais (AGUIAR et al., 2010). Em outro estudo do mesmo grupo, o gel hidrofílico de paromomicina a 10% formulado pela UFMG (aplicado duas vezes ao dia durante 10 dias) foi combinado com miltefosina oral (25 mg/kg/dia durante 10 dias) para o tratamento de camundongos Balb/C experimentalmente infectados com *L. (L.) major*. Essa combinação de medicamentos

reduziu o tamanho das lesões e a carga de parasitas local (lesão) em comparação aos grupos de animais que receberam a miltefosina em monoterapia ou o placebo (AGUIAR et al., 2009).

O gel hidrofílico de paromomicina formulado pela UFMG foi mais uma vez avaliado em combinação. Camundongos Balb/C infectados com *L. (L.) amazonensis* foram tratados com gel hidrofílico de paromomicina a 10% por via tópica (duas vezes ao dia durante 20 dias) associado ao Imiquimod 5% (uma vez ao dia em dias alternados, durante 20 dias). Os resultados deste estudo mostraram baixa eficácia do tratamento associado em relação aos tratamentos isolados. Os autores sugeriram que isso pode ter ocorrido pela alta suscetibilidade do modelo (AGUIAR et al., 2011).

Em estudo *in vitro*, de Morais-Teixeira e colaboradores (2014) mostraram, com modelo de amastigota intracelular, que há sinergismo entre sulfato de paromomicina e diferentes medicamentos leishmanicidas contra espécies de leishmânia do Novo Mundo. Posteriormente, em estudo *in vivo*, de Morais-Teixeira e colaboradores (2015) avaliaram doses baixas de antimoniato de meglumina sistêmico (50 mg Sb^{+5} /kg/dia por 20 dias consecutivos) e miltefosina oral (25 mg/kg/dia por 10 dias alternados), combinados ao gel hidrofílico de paromomicina a 10% formulado pela UFMG, por via tópica (uma vez ao dia durante 20 dias), em animais experimentalmente infectados com *L. (V.) braziliensis*. Os resultados mostraram que as combinações de uma aplicação diária do gel hidrofílico de paromomicina a 10% com doses baixas de miltefosina ou de antimoniato de meglumina foram mais eficazes em reduzir o tamanho das lesões e a carga parasitária (lesão e baço), quando comparado aos medicamentos em monoterapia.

Em ensaio clínico, a combinação entre antimônio de meglumina (20 mg Sb^{+5} /kg/dia x 7 dias) e a pomada de paromomicina/cloreto de metil-benzetônio foi avaliada em pacientes colombianos com leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) panamensis*. A combinação foi eficaz em 90% dos pacientes, após segmento de 12 meses. Entretanto, 25% dos pacientes apresentaram sensação de ardor e prurido e, em 15%, ocorreu formação de bolhas no local da aplicação da pomada (SOTO et al., 1995). Em outro estudo, com pacientes colombianos infectados com *L. (V.) panamensis*, resultados diferentes com a mesma formulação foram obtidos: 58% de taxa de cura, enquanto o tratamento convencional com antimônio pentavalente foi de 84%. O período de segmento deste estudo variou de uma e meio a seis

meses (SOTO et al., 1998). Porém, o critério de cura foi posteriormente contestado, visto que um aumento da lesão pode ter ocorrido devido à reação inflamatória ao cloreto de metilbenzetônio (KRAUSE; KROEGER, 1999).

Outra proposta de combinação entre medicamentos investigou a eficácia *in vitro* e *in vivo* de tamoxifeno e desoxicolato de anfotericina B. O tamoxifeno é um antiestrogênico usado como agente quimioterapêutico e quimiopreventivo contra câncer de mama. Camundongos Balb/C infectados com *L. (L.) amazonensis* foram tratados com 20 doses baixas ou altas de tamoxifeno (6,5 ou 26 mg/kg/dia) e/ou desoxicolato de anfotericina B (1,2 ou 4 mg/kg/dia) pela via intraperitoneal. O tamanho médio das lesões no grupo tratado com os esquemas combinados apresentou maior redução, quando comparado com cada medicamento isolado. Em relação à carga parasitária, foi obtida redução significativa no grupo tratado com as combinações, tanto em doses baixas quanto em doses altas. Assim os resultados do estudo indicam que o tamoxifeno não interfere na atividade da anfotericina B e que as doses mais baixas desses medicamentos proporcionaram boa resposta clínica e parasitológica (TRINCONI et al., 2014).

Em outro estudo, o tamoxifeno foi combinado com a miltefosina oral em ensaios *in vitro* e *in vivo* para *L. (L.) amazonensis*. Os animais (camundongos Balb/C) foram tratados em combinação com metade da dose efetiva dos medicamentos isolados. Os estudos *in vitro* não mostraram interação entre o tamoxifeno e a miltefosina, no entanto, nos estudos *in vivo*, essa combinação foi mais eficaz do que a monoterapia, quando metade das doses efetivas foi aplicada. A eficácia da combinação foi equivalente ao tratamento com a miltefosina em monoterapia com a dose efetiva. O estudo avaliou ainda, que o tamoxifeno foi capaz de dificultar o surgimento da resistência à miltefosina (TRINCONI et al., 2016).

No Brasil, a combinação de medicamentos foi avaliada em pequeno número de pacientes (n=20) em Coorte de Pedra-Bahia, onde *L. (V.) braziliensis* é endêmica. Metade dos pacientes foi tratado com o antimoniato de meglumina (20 mg/kg/dia), durante 20 dias, combinado ao fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF), aplicado por via tópica três vezes por semana, durante três semanas e os outros dez pacientes receberam tratamento com antimoniato de meglumina combinado com placebo de salina fisiológica. A taxa de cura observada foi de 100% para os pacientes tratados com o antimoniato de meglumina

combinado ao GM-CSF e 50% do grupo antimoniato de meglumina combinado com placebo. A combinação do tratamento antimoniato de meglumina/GM-CSF tópico foi considerada efetiva (SANTOS et al., 2004).

Dois estudos realizados no Brasil não mostraram melhora de eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea para os pacientes que receberam pentoxifilina combinada ao antimoniato de meglumina. No primeiro, um estudo piloto, randomizado, duplo-cego, a taxa de cura foi de 56% para os pacientes tratados com antimoniato de meglumina combinado a pentoxifilina e 47% para os tratados com antimoniato de meglumina associado ao placebo, não houve diferença entre os grupos tratados (BRITO et al., 2014). No outro, estudo randomizado, duplo-cego, controlado, a taxa de cura verificada seis meses após o tratamento foi de 45% no grupo de pacientes que recebeu associação com pentoxifilina e 43% no grupo controle, também não houve diferença estatística entre tratamentos (BRITO et al., 2017).

As propostas de combinações de medicamentos para o tratamento da leishmaniose cutânea são variadas e parecem sugerir eficácia superior quando o tratamento combinado é comparado com o medicamento-referência isolado (BÁFICA et al., 2003; MACHADO et al., 2007; DASTGHEIB et al., 2012; SHANEHSAZ et al., 2015; FARAJZADEH et al., 2015; JAFFARY et al., 2016). Além disso, pela utilização de doses menores dos medicamentos, as combinações podem reduzir a frequência e a gravidade dos efeitos adversos, o que pode torná-las alternativa, principalmente para pacientes de risco.

4 METODOLOGIA

4.1 Parasitos

Nesse estudo, foram utilizados isolados de referência *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), mantida em animais no biotério de experimentação animal do Instituto René Rachou/Fiocruz e isolados de *L. (L.) major* (MHOM/IL/80/Friendlin), cedida ao Grupo de Pesquisas Clínicas e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias (PCPP) pela Professora Marta Marques Gontijo de Aguiar da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2 Medicamentos

Foram avaliados neste estudo o gel hidrofílico de paromomicina formulado por Farmanguinhos-Fiocruz (Lote pré-experimental:1604EX038); a anfotericina B lipossomal (AmBisome[®] 50 mg/ frasco - Gilead Sciences/Estados Unidos da América – Lote: 042497) e o antimoniato de meglumina (Glucantime[®] - 81 mg/mL – Sanofi-aventis/Brasil - Lote: 528240) fornecidos pelo Ministério da Saúde do Brasil.

4.3 Modelos experimentais

Os ensaios utilizando *L. (V.) braziliensis* foram conduzidos em hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos, pesando aproximadamente 134,2g ($\pm 4,0$). Os ensaios utilizando *L. (L.) major* foram realizados em camundongos Balb/C (*Mus musculus*) fêmeas de aproximadamente 19g ($\pm 1,3$). O uso de animais neste projeto recebeu aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Fiocruz (CEUA-Fiocruz), licença LW6/13 (Anexo 1).

4.4 Infecção dos animais

Amastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram obtidas de fragmentos de lesão de animais previamente infectados e mantidos pelo grupo PCPP no biotério da Instituição. Esses fragmentos foram removidos e macerados em meio Schneider (Sigma ref. S9895) pH 7,2 não

suplementado. A infecção dos animais ocorreu com injeção subcutânea de 200µL da suspensão de amastigotas na base da cauda de hamsters anestesiados e tricotomizados.

Para a infecção dos camundongos Balb/C com *L. (L.) major*, primeiramente foram retirados fragmentos de lesão de hamsters previamente infectados. Esses fragmentos foram mantidos em cultura contendo meio Schneider pH 7,2, suplementado com soro bovino fetal (SBF – Gibco ref. 10270-106) inativado a 56° C por 30 minutos, acrescido de 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Gibco). A cultura foi mantida em estufa incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio – FANEN, São Paulo, Brasil) a 26 °C durante cinco dias para obtenção das formas promastigotas. Após obtenção dessas formas, nova cultura, nas mesmas condições citadas acima, foi preparada para obtenção de massa de parasitas suficiente para a infecção dos animais. Sete dias após a expansão da cultura, camundongos Balb/C previamente tricotomizados na base da cauda, foram infectados por injeção subcutânea com $1 \times 10^7/50\mu\text{L}$ promastigotas metacíclicas de *L. (L.) major*.

O tratamento dos animais foi iniciado após a ulceração das lesões. Os grupos foram constituídos por quatro a dez hamsteres ou por cinco camundongos.

4.5 Ensaio experimental

4.5.1 Estudo da formulação do gel hidrofílico de paromomicina

Hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*

Para avaliar a atividade do gel hidrofílico de paromomicina, hamsters foram infectados por injeção subcutânea na base da cauda, com suspensão de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. A dose de 200 mgSb⁺⁵/kg/dia foi determinada pelo grupo PCPP, como dose plena para o antimoniato de meglumina no tratamento de animais infectados com *L. (V.) braziliensis* (de MORAIS-TEIXEIRA et al., 2015) e foi incluído neste estudo como controle de animais tratados.

Os seguintes grupos de animais foram formados:

- **PA:** Gel hidrofílico de paromomicina, tópico, administrado duas vezes ao dia, durante 30 dias consecutivos;
- **Glu 200:** Antimoniato de meglumina 200 mgSb⁺⁵/kg/dia, via intramuscular, uma vez ao dia, durante 20 dias consecutivos e acompanhamento de 10 dias;
- **Controle:** Controle sem tratamento, animais infectados e não tratados.

O Gel hidrofílico de paromomicina foi armazenado em temperatura ambiente (20° a 26 °C) e administrado nos animais com o auxílio de uma pipeta dispersora (volume 250 µL, por aplicação). Quando necessário, a casca da lesão dos animais foi remolvida para que houvesse melhor absorção do fármaco. Três dias após o fim do tratamento os animais sofreram eutanásia.

Camundongos infectados com L. (L.) major

Apesar de L. (L.) major não ser uma espécie circulante nas Américas, a avaliação do gel hidrofílico de paromomicina formulado por Farmanguinhos-Fiocruz nesta espécie foi considerada revelante, devido à alta susceptibilidade de L. (L.) major ao tratamento com o gel de paromomicina, demonstrado nos estudos de anteriores.

Dez camundongos, previamente tricotomizados, foram infectados por injeção subcutânea com $1 \times 10^7 / 50 \mu\text{L}$ promastigotas metacíclicas de L. (L.) major.

Os seguintes grupos de animais foram formados:

- **PA:** Gel hidrofílico de paromomicina, tópico, administrado duas vezes ao dia, durante 30 dias consecutivos;
- **Controle:** Controle sem tratamento, animais infectados e não tratados.

Trinta dias após o início do tratamento, os animais sofreram eutanásia.

4.5.2 Estudo de esquemas de tratamento intervalar e em dose única utilizando a anfotericina B lipossomal intraperitoneal em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*

Em resposta a demanda do Ministério da Saúde no ano de 2012, para avaliação da eficácia de diferentes formulações de anfotericina, foram realizados pelo grupo PCPP estudos de dose resposta em animais infectados com *L. (V.) braziliensis*. Neste estudo, a anfotericina B lipossomal foi utilizada por via intraperitoneal nas doses de 5,0; 2,5; 1,0 e 0,5 mg/kg/dia, durante 10 dias alternados. A menor dose de anfotericina B lipossomal que demonstrou eficácia clínica e parasitológica no modelo estudado, foi a de 1 mg/kg/dia, com dose acumulada de 10 mg/kg. Assim essa dose (10 mg/kg) foi escolhida para esquema de duração mais curta, de cinco dias (2 mg/kg/dia) e também em dose única de 10 mg/kg.

Quarenta hamsters foram infectados com suspensão de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* por injeção subcutânea na base da cauda. Os animais foram divididos em quatro grupos (n=10), de modo que as médias de tamanho de lesão entre os grupos não apresentassem diferença estatística inicial significativa. Para avaliação de eficácia parasitológica, metade dos animais de cada grupo sofreu eutanásia três dias após o fim do tratamento; para avaliação de eficácia clínica, a outra metade dos animais foi acompanhada por 20 dias após o fim do tratamento.

Grupos avaliados:

- **AnfLipo 10mg-DU**: Anfotericina B lipossomal 10 mg/kg, administrado via intraperitoneal, esquema de dose única;
- **AnfLipo 2mg-5dias**: Anfotericina B lipossomal 2 mg/kg/dia, administrado por 5 dias consecutivos, pela via intraperitoneal (dose total 10 mg/kg);
- **Controle-10mg-DU**: Controle sem tratamento, animais infectados e não tratados, do grupo de animais tratados com anfotericina B lipossomal 10 mg/kg dose única;
- **Controle-2mg-5dias**: Controle sem tratamento, animais infectados e não tratados, do grupo de animais tratados com anfotericina B lipossomal 2 mg/kg/dia, administrado por 5 dias consecutivos.

4.5.3 Estudo de definições de esquemas de tratamento utilizando antimoniato de meglumina por via intralesional em hamsteres infectados com *L. (V.) braziliensis*

Com o objetivo de avaliar o antimoniato de meglumina intralesional no modelo hamster em diferentes esquemas terapêuticos com essa via de administração, foi conduzido um estudo com 20 animais infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com os seguintes esquemas:

- **GluIL-Semanal:** Uma infiltração intralesional de antimoniato de meglumina, ao dia, realizada semanalmente, até que houvesse a cicatrização completa da lesão ou por no máximo oito aplicações;
- **GluIL-Quinzenal:** Uma infiltração intralesional de antimoniato de meglumina, ao dia, realizada quinzenalmente, até que houvesse a cicatrização completa da lesão ou por no máximo quatro aplicações;
- **GluIL-IU:** Uma infiltração intralesional de antimoniato de meglumina, infiltração única;
- **Controle:** Controle sem tratamento, animais infectados e não tratados.

A eutanásia de todos os animais somente ocorreu após o grupo “**GluIL-Semanal**” completar seu protocolo de tratamento (oito infiltrações, durante oito semanas), para que todos os animais do ensaio tivessem o mesmo tempo de avaliação do tamanho das lesões.

O procedimento de infiltração intralesional com o antimoniato de meglumina foi realizado a partir de adaptação de protocolo de infiltração intralesional com o antimoniato de meglumina para o tratamento de pacientes portadores de leishmaniose cutânea padronizado por Silva e colaboradores (2017).

Em resumo, os animais foram anestesiados com Cetamina (Cetamin 10% - Syntec, São Paulo-Brasil) 100 mg/kg e Xilazina (Xilazin 2% - Syntec, São Paulo-Brasil) 5 mg/kg por via intramuscular. O antimoniato de meglumina foi aspirado da ampola com uma seringa de 1mL de insulina acoplada a uma agulha (13x4,5 mm). Com os animais anestesiados, a agulha foi posicionada na pele saudável do animal, próximo à borda da lesão, em um ângulo de aproximado de 30° e introduzida em direção ao centro da lesão. Após aspiração para verificação de possível perfuração de vasos sanguíneos, foi realizada a infiltração do antimoniato de meglumina. Este procedimento foi realizado em quatro botões de aplicação,

seguindo os pontos cardiais, até que ocorresse saturação e entumescimento das bordas e do centro da lesão.

4.5.4 Estudo de combinação binária entre o gel de paromomicina, anfotericina B lipossomal intraperitoneal e antimoniato de meglumina intralesional em hamsters experimentalmente infectados com *L. (V.) braziliensis*

Os esquemas de tratamento para o anfotericina B lipossomal intraperitoneal e antimoniato de meglumina intralesional foram definidos nos estudos prévios, como descrito acima.

Para a avaliação da eficácia das combinações entre o gel hidrofílico de paromomicina, anfotericina B lipossomal e antimoniato de meglumina por via intralesional, 28 hamsters foram infectados com suspensão de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Após o desenvolvimento das lesões, os seguintes grupos de animais foram avaliados:

- **PA + Glu IL**: Gel hidrofílico de paromomicina, por via tópica, administrado duas vezes ao dia, durante 30 dias consecutivos + antimoniato de meglumina intralesional, administrado no primeiro dia de tratamento em infiltração única;
- **PA + AnfLipo**: Gel hidrofílico de paromomicina, por via tópica, administrado duas vezes ao dia, durante 30 dias consecutivos + anfotericina B lipossomal 10 mg/kg, via intraperitoneal, administrada no primeiro dia de tratamento em dose única;
- **Glu IL + AnfLipo**: Antimoniato de meglumina intralesional, administrado no primeiro dia de tratamento em infiltração única + anfotericina B lipossomal 10 mg/kg, via intraperitoneal, administrada no primeiro dia de tratamento em dose única;
- **Glu IL**: Antimoniato de meglumina intralesional, administrado no primeiro dia de tratamento em infiltração única;
- **AnfLipo**: Anfotericina B lipossomal 10 mg/kg, via intraperitoneal, administrada no primeiro dia de tratamento em dose única;
- **PA**: Gel hidrofílico de paromomicina, por via tópica, administrado duas vezes ao dia, durante 30 dias consecutivos;
- **Controle**: Controle sem tratamento, animais infectados e não tratados.

Trinta e três dias após o início do tratamento, os animais sofreram eutanásia.

O placebo do gel de PA já havia sido avaliado em estudos prévios conduzidos pelo Grupo, que comprovaram que ele não tem eficácia, sendo assim não se considerou necessário incluir novamente essa avaliação.

4.6 Avaliação da eficácia dos esquemas terapêuticos

4.6.1 Eficácia clínica

A eficácia clínica dos tratamentos foi avaliada pelo acompanhamento semanal da medida do maior diâmetro (milímetros-mm) do tamanho das lesões com auxílio de paquímetro digital (Digimess). A aferição foi realizada no início do tratamento (D1), 7, 14 e 21 dias após o início do tratamento (D7, D14 e D21) e 20 dias após o fim do tratamento – dia da eutanásia (D21 – para os esquemas de tratamento em dose única, e D25 para os esquemas de tratamento de cinco dias consecutivos), quando o tratamento foi avaliado para o anfotericina B lipossomal.

Nos ensaios com duração de tratamento de 30 dias (gel hidrofílico de paromomicina e ensaio de combinação), os seguintes tempos foram avaliados: D1, D7, D14, D21 (21 dias após o início do tratamento), D28 (28 dias após o início do tratamento) e D33 (33 dias após o início do tratamento – dia da eutanásia).

No ensaio de avaliação do antimoniato de meglumina intralesional, o tamanho da lesão foi avaliado nos tempos: D1, D7, D14, D21, D28, D35 (35 dias após o início do tratamento), D42 (42 dias após o início do tratamento), D49 (49 dias após o início do tratamento) e D52 (52 dias após o início do tratamento – dia da eutanásia).

Foram avaliados também o percentual da eficácia clínica e a cura completa das lesões baseados nas médias (das lesões) obtidas no início do tratamento (D1) e no dia da eutanásia.

4.6.2 Eficácia parasitológica

Para avaliar a eficácia do tratamento sobre os parasitas, foi empregada a técnica de diluição limitante. Três ou 20 dias após a fim do tratamento, os animais sofreram eutanásia em câmara de CO₂ e tiveram lesão e baço removidos e colocados em tubos Falcon de 15 ou 50 mL (Corning Science México S.A., Tamaulipas, México) estéreis contendo 3 mL de meio de cultura Schneider pH 7,2 não suplementado. As amostras foram pesadas e homogeneizadas em Ultra-Turrax® (IKA, Germany). Em seguida, o material foi centrifugado a 1620 g (lesão) ou 45g (baço), por dois minutos para sedimentação. O sobrenadante foi separado e centrifugado a 1700 g por 15 minutos (lesão) ou 1620 g por dois minutos (baço). O **pellet** formado foi ressuspensionado em 1 mL de meio Schneider pH 7,2 suplementado com soro bovino fetal inativado a 56° C por 30 minutos, acrescido de 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. A diluição foi realizada em triplicata (1:10) em cultivos sucessivos em placas estéreis de 96 poços (TPP ref. 92097), que foram incubadas a 26 °C por sete dias. Cada poço foi examinado em microscópio de inversão (Olympus CK30) para avaliar a presença de parasitas viáveis. A carga de parasitas foi determinada a partir da menor diluição em que o crescimento foi observado (TITUS et al., 1985).

4.6.3 Avaliação da toxicidade dos medicamentos

A toxicidade dos medicamentos testados foi avaliada por meio da mensuração da massa corpórea, antes, durante (semanalmente) e após o tratamento.

4.7 Análise dos dados

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5 for Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Os dados obtidos para carga parasitária (transformados em Log+1) e tamanho médio da lesão foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov (KS) ou D'Agostino & Pearson. Estes dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e em caso de diferença estatística, os dados foram submetidos ao teste de Tukey. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$. Para os dados não paramétricos foi usado o teste Kruskal-Wallis.

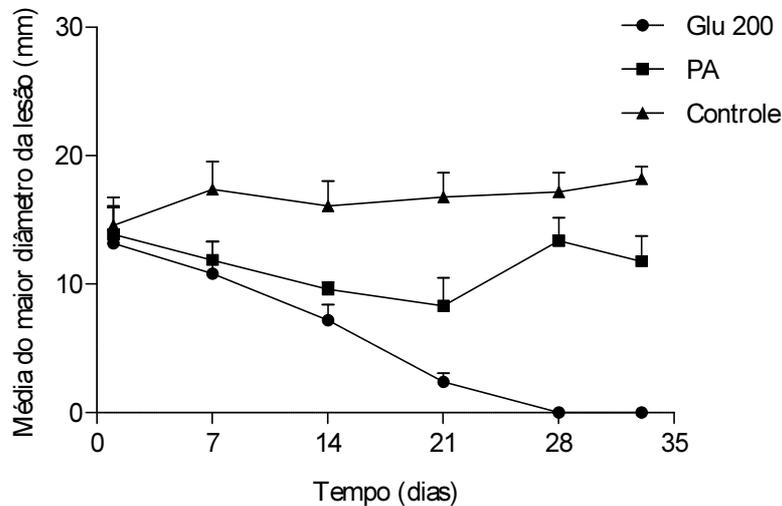
5 RESULTADOS

5.1 Estudo da formulação do gel hidrofílico de paromomicina em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* e camundongos infectados com *L. (L.) major*

Eficácia clínica

O tamanho das lesões foi avaliado através da redução das lesões em função ao tempo de tratamento. No Gráfico 1, é possível observar a redução do tamanho das lesões dos hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*. O grupo de animais tratados com o antimoniato de meglumina 200 mg Sb⁺⁵/kg/dia durante 20 dias consecutivos, apresentou redução estatística significativa em relação ao grupo controle sem tratamento aos 21 dias do início do tratamento (D21), redução que se manteve até o dia da eutanásia dos animais (D33) ($p < 0,05$). O grupo de animais que recebeu o gel hidrofílico de paromomicina tópico administrado duas vezes ao dia, durante 30 dias consecutivos, apresentou tendência de redução do tamanho médio das lesões até D21, no entanto não apresentou diferença estatística significativa nos tempos avaliados em relação ao grupo controle sem tratamento ($p > 0,05$).

GRÁFICO 1 Tamanho médio das lesões de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com gel hidrofílico de paromomicina tópico ou antimoniato de meglumina intramuscular

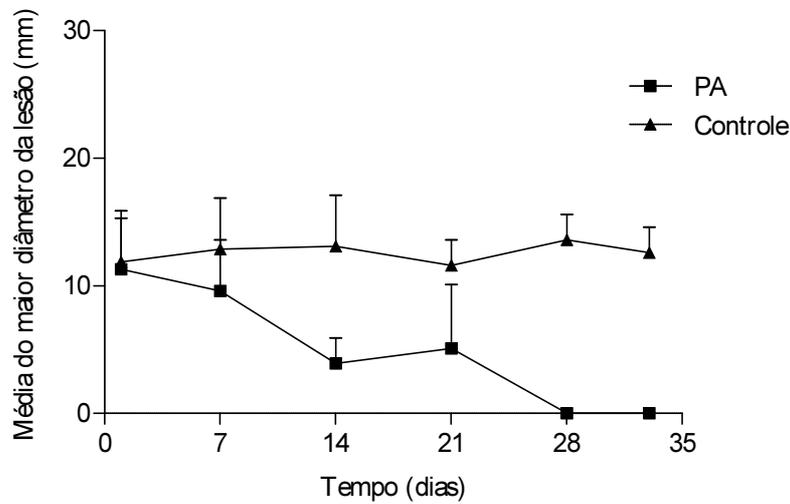


LEGENDA: Tamanho médio das lesões (mm) de hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos (n=5) infectados na base da cauda com 200 μ L de suspensão de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e tratados com gel hidrofílico de paromomicina tópico, administrado duas vezes ao dia, durante 30 dias consecutivos ou antimoniato de meglumina por via intramuscular 200 mgSb⁺⁵mg/kg/dia, durante 20 dias consecutivos. As lesões foram medidas a cada sete dias e os animais sofreram eutanásia 33 dias após o início do tratamento. As barras verticais representam o desvio-padrão da média do maior diâmetro das lesões de cada grupo. Diferença estatística significativa foi observada a partir de D21 e se manteve até o dia da eutanásia (D33) para o grupo de animais tratado com antimoniato de meglumina 200 mgSb⁺⁵mg/kg/dia em relação ao grupo controle sem tratamento ($p < 0,05$). O grupo de animais tratados com o gel hidrofílico de paromomicina não apresentou diferença estatística significativa em nenhum dos tempos avaliados ($p > 0,05$). Glu 200: Antimoniato de meglumina 200 mgSb⁺⁵mg/kg/dia x 20 dias consecutivos; PA: Gel hidrofílico de paromomicina; Controle: animais infectados e não tratados.

FONTE: Elaborado pelo autor.

Na avaliação da eficácia clínica do gel hidrofílico de paromomicina em camundongos infectados com *L. (L.) major* foi observado diferença estatística significativa no grupo de animais tratados em relação ao grupo controle sem tratamento a partir de D28 ($p < 0,05$) (GRÁFICO 2).

GRÁFICO 2 Tamanho médio das lesões de camundongos infectados com *L. (L.) major* e tratados com gel hidrofílico de paromomicina tópico



LEGENDA: Tamanho médio das lesões (mm) de camundongos Balb/C (*Mus musculus*) fêmeas (n=5) infectados na base da cauda com $1 \times 10^7/50\mu\text{L}$ promastigotas metacíclicas de *L. (L.) major* e tratados com gel hidrofílico de paromomicina tópico administrado duas vezes ao dia, durante 30 dias consecutivos. As lesões foram medidas a cada sete dias e os animais sofreram eutanásia 33 dias após o início do tratamento. As barras verticais representam o desvio-padrão da média do maior diâmetro das lesões de cada grupo. Diferença estatística significativa foi observada a partir de D28 para o grupo de animais tratados com o gel hidrofílico de paromomicina em relação ao grupo controle sem tratamento ($p < 0,05$). PA: Gel hidrofílico de paromomicina; Controle: animais infectados e não tratados.

FONTE: Elaborado pelo autor.

Foi calculado também o percentual de redução do tamanho médio das lesões entre o tempo D1 (início do tratamento) e D33 (dia da eutanásia) e o percentual de cura completa das lesões (TABELA 1). Os animais infectados com *L. (V.) braziliensis* que receberam o esquema de tratamento com o antimoníato de meglumina (200 mg/kg/dia) reduziram em 100% o tamanho de suas lesões e todos os animais apresentaram cura completa 100% (5/5). O gel hidrofílico de paromomicina foi eficaz em reduzir 15% o tamanho das lesões dos animais do grupo PA. O grupo controle não apresentou redução das lesões.

Nos camundongos infectados com *L. (L.) major* o gel hidrofílico de paromomicina foi eficaz em reduzir 100% o tamanho das lesões e todos os animais apresentaram cura completa das lesões (5/5) (TABELA 1).

TABELA 1 Eficácia clínica da formulação do gel hidrofílico de paromomicina no tratamento de animais infectados com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major*

Eficácia Clínica*			
Modelo animal/ Espécie de leishmania	Esquemas de tratamento	Redução no tamanho da lesão (%)	Cura completa da lesão (%)
Hamster/ <i>L. (V.) braziliensis</i>	Glu 200	100,0	100,0
	PA	15,0	0,0
	Controle	0,0	0,0
Camundongos/ <i>L. (L.) major</i>	PA	100,0	100,0
	Controle	0,0	0,0

*O tamanho médio das lesões foi calculado pelo maior diâmetro (mm).

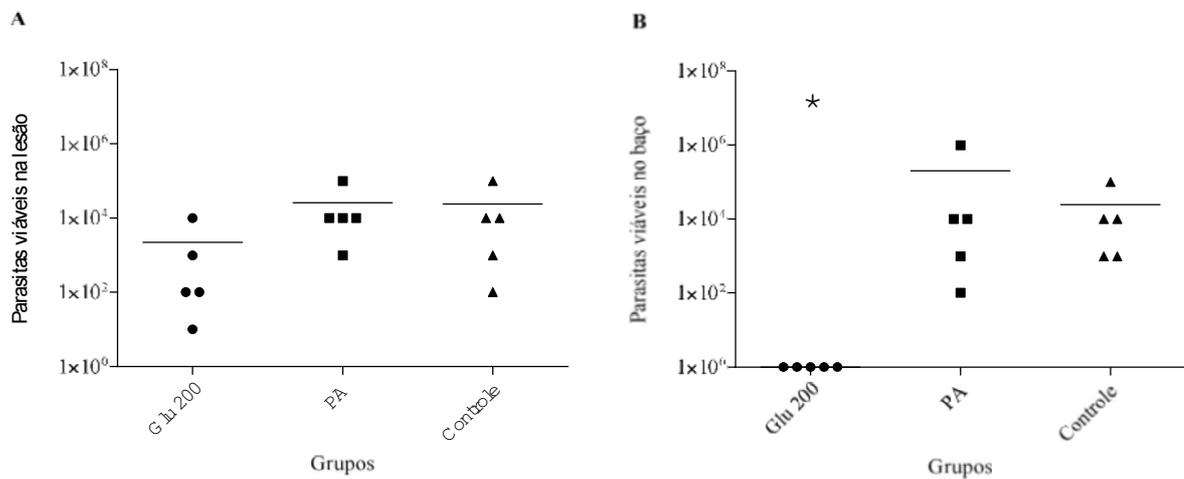
LEGENDA: O percentual de redução do tamanho médio das lesões e a cura completa foram obtidos considerando relação entre os valores médios das lesões no tempo D1 (início do tratamento) e D33 (dia da eutanásia). Glu 200: antimoniato de meglumina 200 mg/kg/dia x 20 dias consecutivos; PA: Gel hidrofílico de paromomicina; Controle: animais infectados e não tratados.

FONTE: Elaborado pelo autor.

Eficácia parasitológica

Na avaliação da eficácia parasitológica em hamsteres infectados com *L. (V.) braziliensis*, não houve diferença estatística significativa entre os grupos de animais tratados e o grupo controle na avaliação de parasitas viáveis na lesão (A) ($p > 0,05$). No baço (B), diferença estatística significativa foi observada em animais tratados com antimoniato de meglumina 200 mgSb⁺⁵/kg/dia x 20 dias consecutivos em relação ao grupo controle sem tratamento ($*p < 0,05$) (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 3 Parasitas viáveis na lesão e baço de hamsters infectados por *L. (V.) braziliensis* e tratados com gel hidrofílico de paromomicina tópico ou antimoniato de meglumina intramuscular

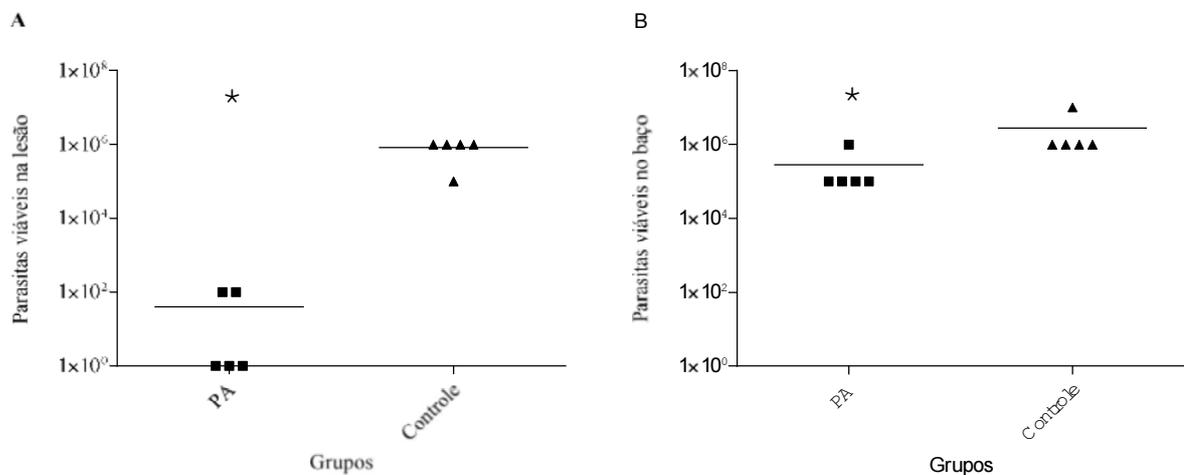


LEGENDA: Parasitas viáveis na lesão (A) e baço (B) de hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos (n=5) infectados na base da cauda com 200 μ L de suspensão de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e tratados com gel hidrofílico de paromomicina tópico, administrado duas vezes ao dia, durante 30 dias consecutivos ou antimoniato de meglumina por via intramuscular 200 mgSb⁺⁵mg/kg/dia, durante 20 dias consecutivos. O número de parasitas foi determinado através da técnica de diluição limitante realizada no dia da eutanásia dos animais (33 dias após o início do tratamento). As barras horizontais representam a média de parasitas viáveis nas lesões ou nos baços para cada grupo. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de animais tratados e o grupo controle na avaliação de parasitas viáveis na lesão ($p>0,05$). Diferença estatística significativa foi observada na avaliação de parasitas viáveis do baço de animais tratados com antimoniato de meglumina 200 mgSb⁺⁵mg/kg/dia x 20 dias consecutivos em relação ao grupo controle sem tratamento ($*p<0,05$). Glu 200: antimoniato de meglumina 200 mgSb⁺⁵mg/kg/dia x 20 dias consecutivos; PA: Gel hidrofílico de paromomicina; Controle: animais infectados e não tratados.

FONTE: Elaborado pelo autor.

Em camundongos infectados com *L. (L.) major* (GRÁFICO 4), houve diferença estatística significativa entre o grupo de animais tratado e o grupo controle sem tratamento na avaliação de parasitas viáveis na lesão (A) e no baço (B) ($*p>0,05$)

GRÁFICO 4 Parasitas viáveis na lesão e baço de camundongos infectados com *L. (L.) major* e tratados com gel hidrofílico de paromomicina tópico



LEGENDA: Parasitas viáveis na lesão (A) e baço (B) camundongos Balb/C (*Mus musculus*) fêmeas (n=5) infectados na base da cauda com $1 \times 10^7/50\mu\text{L}$ promastigotas metacíclicas de *L. (L.) major* e tratados com gel hidrofílico de paromomicina tópico administrado duas vezes ao dia, durante 30 dias consecutivos. Os parasitas foram determinados através da técnica de diluição limitante realizada no dia da eutanásia dos animais (33 dias após o início do tratamento). As barras horizontais representam a média de parasitas viáveis nas lesões ou nos baços para cada grupo. Diferença estatística significativa foi observada na avaliação de parasitas viáveis na lesão e no baço de animais tratados com o gel hidrofílico de paromomicina em relação ao grupo controle sem tratamento (* $p < 0,05$). PA: Gel hidrofílico de paromomicina; Controle: animais infectados e não tratados.

FONTE: Elaborado pelo autor.

A toxicidade clínica dos medicamentos nos animais foi avaliada através da massa corpórea durante e após o tratamento. Os animais não tiveram perda de massa significativa em nenhum momento da avaliação ($p > 0,05$) e nem manifestaram características que pudessem indicar efeito tóxico (pelo eriçado, agressividade, diarreia ou outros).

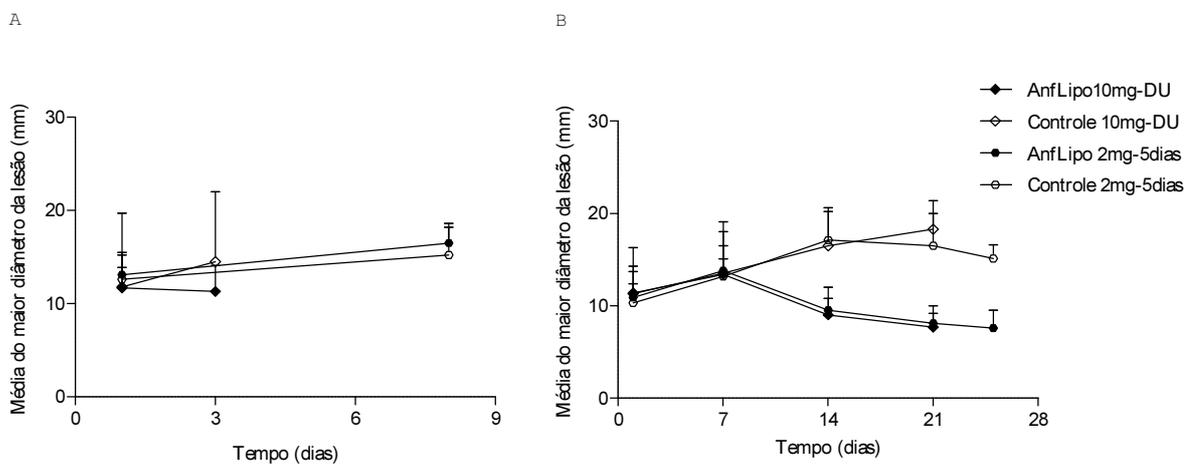
5.2 Estudo de esquemas de tratamento intervalar e em dose única utilizando a anfotericina B lipossomal intraperitoneal em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*

Eficácia clínica

Hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* foram tratados com anfotericina B lipossomal dose única de 10 mg/kg ou doses intervalares de 2 mg/kg/dia durante cinco dias consecutivos. Os animais sofreram eutanásia três ou 20 dias após o fim do tratamento. Cada esquema de tratamento teve seu controle infectado e não tratado. Não houve redução significativa no tamanho da lesão dos animais que sofreram eutanásia três dias após o fim do tratamento ($p > 0,05$) (GRÁFICO 5-A).

Gráfico 5-B apresenta dados de eficácia clínica (tamanho da lesão), dos animais que sofreram eutanásia 20 dias após o fim do tratamento. Observa-se que ocorreu redução do tamanho médio das lesões para os grupos tratados aos 14 dias do início do tratamento (D14), que se mantém até o dia da eutanásia. Os grupos de animais que receberam tratamento apresentaram diferença estatística significativa em relação aos controles sem tratamento ($p < 0,05$). As lesões dos animais dos grupos controles sem tratamento se mantiveram em progressão, durante todo o período avaliado (GRÁFICO 5-B).

GRÁFICO 5 Tamanho médio das lesões de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com anfotericina B lipossomal intraperitoneal



LEGENDA: Tamanho médio das lesões (mm) de hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos ($n=5$) infectados na base da cauda com 200 μ L de suspensão de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e tratados por via intraperitoneal com anfotericina B lipossomal 10 mg/kg, esquema de dose única ou anfotericina B lipossomal 2 mg/kg/dia, administrado por 5 dias consecutivos. As lesões foram medidas a cada sete dias e os animais sofreram eutanásia três dias após o fim do tratamento (A) ou 20 dias após o fim do tratamento (B). As barras verticais representam o desvio-padrão da média do maior diâmetro das lesões de cada grupo. Diferença estatística significativa foi obtida a partir de D14 (14 dias após o início do tratamento) para os grupos de animais tratados em relação ao controle sem tratamento ($p < 0,05$). AnfLipo 10 mg-DU: anfotericina B lipossomal 10 mg/kg, dose única; AnfLipo 2mg-5dias: anfotericina B lipossomal 2 mg/kg/dia, administrado por 5 dias consecutivos; Controle-10mg-DU: animais infectados e não tratados, do grupo de animais tratados com anfotericina B lipossomal 10mg/kg dose única; Controle-2mg-5dias: animais infectados e não tratados, do grupo de animais tratados com anfotericina B lipossomal 2 mg/kg/dia, administrado por 5 dias consecutivos.

FONTE: Elaborado pelo autor.

O percentual de redução do tamanho médio das lesões no dia da eutanásia (três dias ou 20 dias após o fim do tratamento) em comparação ao tempo inicial do tratamento (D1) e o percentual de cura completa dos animais também foi calculado (TABELA 2). Não houve redução do tamanho das lesões quando os animais sofreram eutanásia 3 dias após o fim do tratamento. As doses avaliadas (AnfLipo 2mg-5dias e AnfLipo 10mg-DU) foram similares em reduzir o tamanho das lesões dos animais que sofreram eutanásia 20 dias após o fim dos

tratamentos (32,5% e 30,3% respectivamente). Os animais do grupo controle não apresentaram redução no tamanho das lesões. Nenhum animal dos grupos tratados ou controle apresentou cicatrização completa da lesão nos tempos de acompanhamento avaliados (TABELA 2).

TABELA 2 Eficácia clínica de esquemas de tratamentos utilizando a anfotericina B lipossomal em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*

Esquemas de tratamento	Eficácia Clínica*			
	Eutanásia 3 dias após o fim do tratamento		Eutanásia 20 dias após o fim do tratamento	
	Redução no tamanho da lesão (%)	Cura completa da lesão (%)	Redução no tamanho da lesão (%)	Cura completa da lesão (%)
AnfLipo 10mg-DU	0,0	0,0	32,5	0,0
Controle-10mg-DU	0,0	0,0	0,0	0,0
AnfLipo 2mg-5dias	0,0	0,0	30,3	0,0
Controle-2mg-5dias	0,0	0,0	0,0	0,0

* O tamanho médio das lesões foi calculado pelo maior diâmetro (mm).

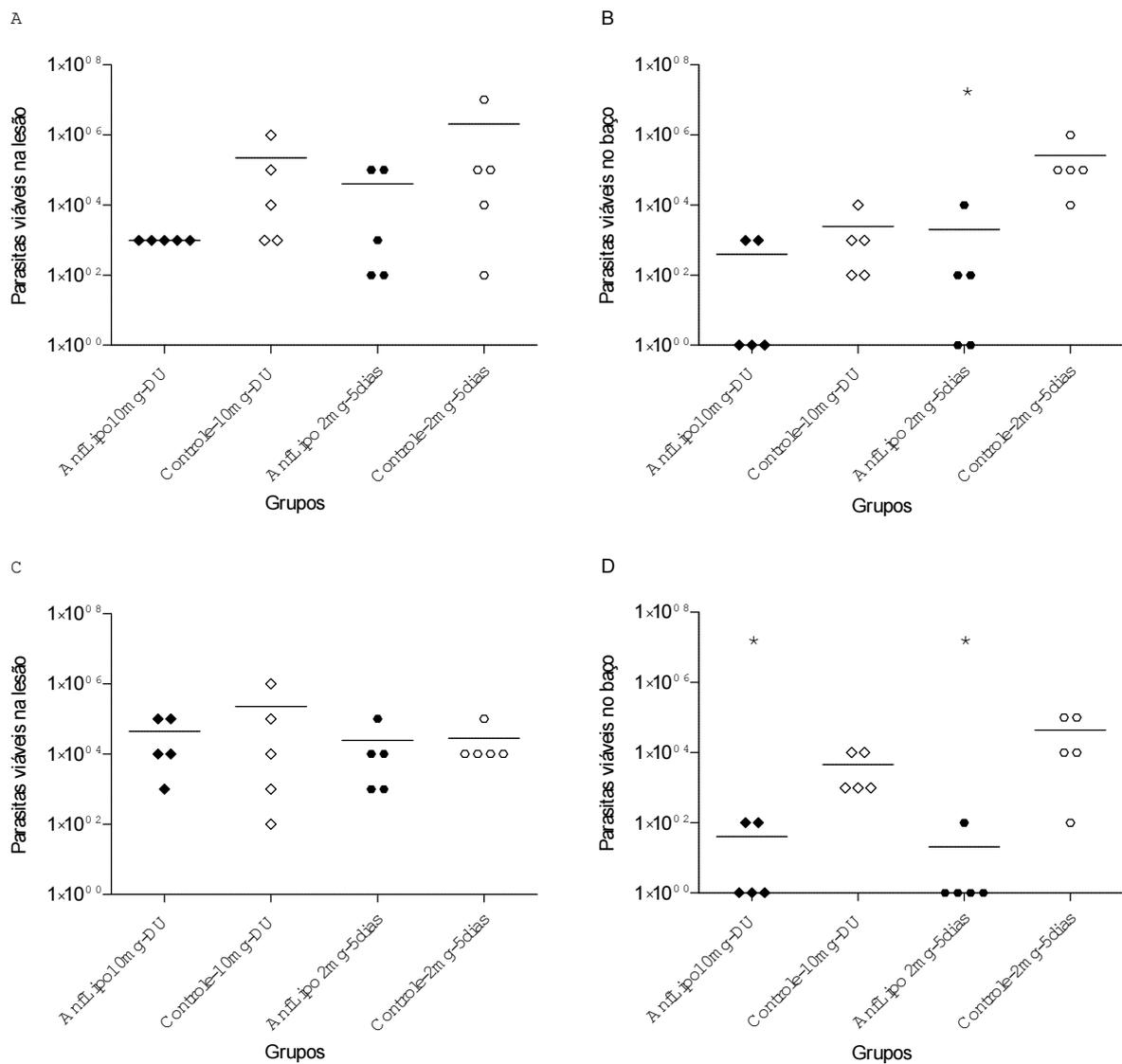
LEGENDA: O percentual de redução do tamanho médio das lesões e a cura completa foram obtidos considerando a relação entre os valores médios das lesões no tempo D1 (início do tratamento) e D21 ou D25 (dia da eutanásia- D21 para o grupo AnfLipo 10 mg-DU e D25 para o grupo AnfLipo 2mg-5dias). AnfLipo 10 mg-DU: anfotericina B lipossomal 10 mg/kg, dose única; AnfLipo 2mg-5dias: anfotericina B lipossomal 2 mg/kg/dia, administrado por 5 dias consecutivos; Controle-10mg-DU: animais infectados e não tratados, do grupo de animais tratados com anfotericina B lipossomal 10mg/kg dose única; Controle-2mg-5dias: animais infectados e não tratados, do grupo de animais tratados com anfotericina B lipossomal 2 mg/kg/dia, administrado por 5 dias consecutivos.

FONTE: Elaborado pelo autor.

Eficácia parasitológica

Na avaliação da eficácia parasitológica e eutanásia três dias após o fim do tratamento, observou-se diferença estatística significativa no baço do grupo de animais tratados com AnfLipo 2mg-5dias em relação ao controle sem tratamento (* $p < 0,05$) (GRÁFICO 6-B). Quando os animais sofreram eutanásia 20 dias após o fim do tratamento, diferença estatística significativa foi observada no baço, nos dois esquemas de tratamento avaliados em relação ao controle sem tratamento (* $p < 0,05$) (GRÁFICO 6-D). Nas lesões não houve diferença estatística significativa na redução de parasitas viáveis nos dois esquemas e tempos de acompanhamento avaliados ($p > 0,05$) (GRÁFICO 6-A e C).

GRÁFICO 6 Parasitas viáveis na lesão e baço de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com anfotericina B lipossomal intraperitoneal



LEGENDA: Parasitas viáveis na lesão (A e C) e baço (B e D) de hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos (n=5) infectados na base da cauda com 200 μ L de suspensão de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e tratados por via intraperitoneal com anfotericina B lipossomal 10 mg/kg, esquema de dose única ou anfotericina B lipossomal 2 mg/kg/dia, administrado por 5 dias consecutivos. Os parasitas foram determinados através da técnica de diluição limitante três (A e B) e 20 (C e D) dias após o fim do tratamento. As barras horizontais representam a média de parasitas viáveis nas lesões e baços de cada grupo. Diferença estatística significativa em relação ao controle sem tratamento foi obtida na avaliação da carga parasitária do baço do grupo AnfLipo 2mg-5 dias aos três dias do fim do tratamento e dos grupos AnfLipo 10mg-DU e AnfLipo 2mg-5 dias aos 20 dias do fim do tratamento (* $p < 0,05$).

FONTE: Elaborado pelo autor.

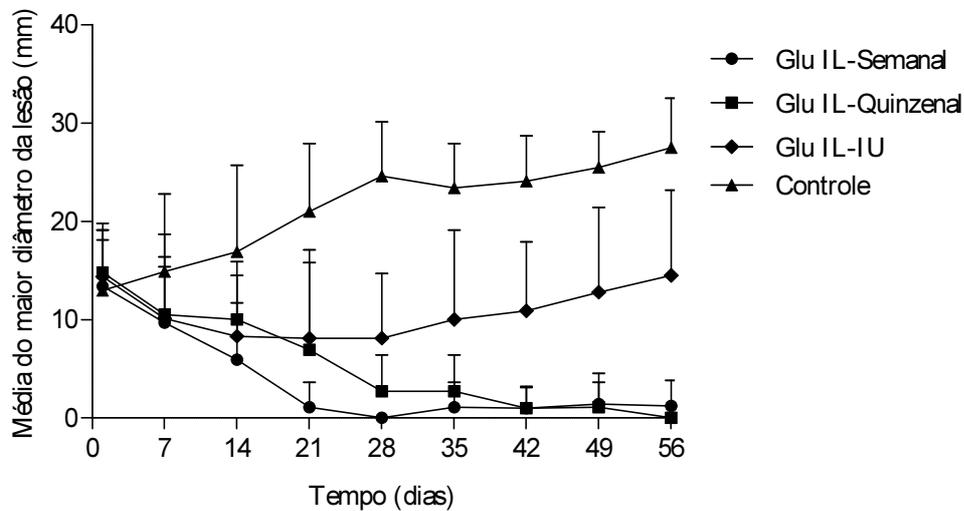
Nenhuma das doses promoveu perda de massa corporal significativa em todos os tempos avaliados ($p > 0,05$).

5.3 Estudo de definições de esquemas de tratamento utilizando antimoniato de meglumina por via intralesional em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*

Eficácia clínica

Hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* foram tratados com o antimoniato de meglumina intralesional em diferentes esquemas, sendo que o ensaio teve duração de 56 dias. Observa-se no Gráfico 7, a redução no tamanho das lesões para os três grupos de animais tratados, enquanto o tamanho das lesões dos animais do grupo controle permaneceu em progressão durante o período avaliado. Aos 21 dias após a primeira infiltração do antimoniato de meglumina por via intralesional, o tamanho das lesões do grupo de animais tratados semanalmente apresentou redução com significância estatística em relação ao grupo controle sem tratamento ($p < 0,05$). Aos 28 dias após a primeira infiltração do antimoniato de meglumina, tamanho das lesões dos grupos de animais tratados semanalmente e quinzenalmente apresentaram redução com significância estatística em relação ao controle sem tratamento. Essa diferença permaneceu até o dia da eutanásia dos animais (56 dias após a primeira aplicação do antimoniato de meglumina- $p < 0,05$) (GRÁFICO 7). O grupo de animais que recebeu única infiltração do antimoniato de meglumina intralesional não apresentou diferença estatística em relação ao controle sem tratamento em nenhum momento da avaliação ($p > 0,05$), no entanto, é possível observar no Gráfico 7, que esse esquema de tratamento levou à redução e estabilização das lesões dos animais até os 28 dias após a infiltração.

GRÁFICO 7 Tamanho médio das lesões de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados antimoniato de meglumina intralesional



LEGENDA: Tamanho médio das lesões (mm) de hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos (n=5) infectados na base da cauda com 200 μ L de suspensão de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e tratados em diferentes esquemas com antimoniato de meglumina por via intralesional. As lesões foram medidas a cada sete dias e os animais sofreram eutanásia 56 dias após o início do tratamento. As barras verticais representam o desvio-padrão da média do maior diâmetro das lesões de cada grupo. Diferença estatística significativa foi obtida a partir de D21 (21 dias após o início do tratamento) para o grupo de animais que recebeu infiltração semanalmente ($p < 0,05$). Em D28 (28 dias após o início do tratamento) os grupos de animais tratados semanalmente e quinzenalmente apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle sem tratamento ($p < 0,05$). O grupo de animais que recebeu única infiltração do antimoniato de meglumina intralesional não apresentou diferença estatística em relação ao controle sem tratamento em nenhum momento da avaliação ($p > 0,05$), mas levou a redução e estabilização das lesões dos animais até os 28 dias após a infiltração. Glu IL-Semanal: antimoniato de meglumina intralesional administrado uma vez por semana; Glu IL-Quinzenal: antimoniato de meglumina intralesional administrado de 15 em 15 dias; Glu IL-IU: antimoniato de meglumina intralesional administrado em única infiltração; Controle: animais infectados e não tratados.

FONTE: Elaborado pelo autor.

A eficácia clínica do antimoniato de meglumina intralesional em diferentes esquemas de tratamento também está apresentada na Tabela 3. Foi calculado o percentual de redução do tamanho das lesões no D56 (dia da eutanásia) em comparação ao tempo inicial do tratamento (D1) e o percentual de cura completa dos animais. Houve redução do tamanho das lesões de 91% e 100% nos grupos Glu IL-Semanal e Glu IL-Quinzenal, respectivamente. Não houve redução do tamanho das lesões dos animais no D56 para o grupo tratado com antimoniato de meglumina infiltração única e controle sem tratamento. Cura completa da lesão foi obtida em 80% (4/5), 100% (5/5) e 20% (1/5) dos grupos Glu IL-Semanal, Glu IL-Quinzenal e Glu IL-IU, respectivamente. Mesmo com um animal apresentando cura completa da lesão, a média de tamanho da lesão no grupo Glu IL-IU não reduziu, uma vez que as lesões dos outros animais do grupo aumentaram de tamanho com o passar do tempo do ensaio.

TABELA 3 Eficácia clínica do antimoniato de meglumina por via intralesional no tratamento de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*

Esquemas de tratamento	Eficácia Clínica*	
	Redução no tamanho da lesão (%)	Cura completa da lesão (%)
Glu IL-Semanal	91,0	80,0
Glu IL-Quinzenal	100,0	100,0
Glu IL-IU	0,0	20,0
Controle	0,0	0,0

* O tamanho médio das lesões foi calculado pelo maior diâmetro (mm).

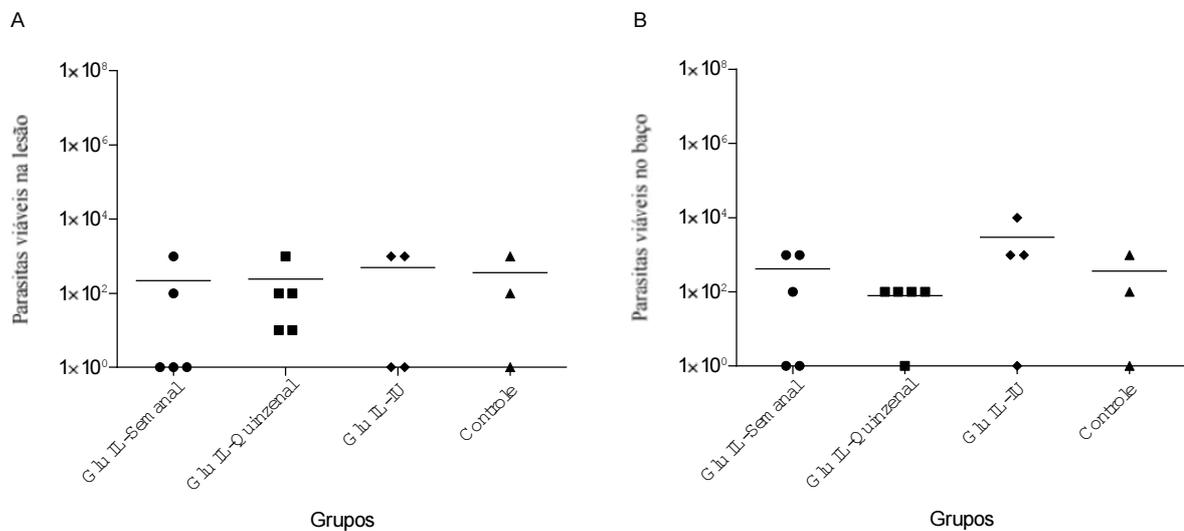
LEGENDA: O percentual de redução do tamanho médio das lesões e a cura completa foram obtidos considerando a relação entre os valores médios das lesões no tempo D1 (início do tratamento) e D56 (dia da eutanásia). Glu IL-Semanal: antimoniato de meglumina intralesional administrado uma vez por semana; Glu IL-Quinzenal: antimoniato de meglumina intralesional administrado de 15 em 15 dias; Glu IL-IU: antimoniato de meglumina intralesional administrado em única infiltração; Controle: animais infectados e não tratados.

FONTE: Elaborado pelo autor.

Eficácia parasitológica

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de animais tratados em relação ao controle sem tratamento, na avaliação de parasitas viáveis na lesão (A) e no baço (B) (GRÁFICO 8).

GRÁFICO 8 Parasitas viáveis na lesão e baço de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com antimoníato de meglumina intralesional



LEGENDA: Parasitas viáveis na lesão (A) e baço (B) de hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos (n=5) infectados na base da cauda com 200 μ L de suspensão de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e tratados em diferentes esquemas com antimoníato de meglumina por via intralesional. Os parasitas foram determinados através da técnica de diluição limitante no dia da eutanásia dos animais, D56 (56 dias do início do tratamento). As barras horizontais representam a média de parasitas viáveis nas lesões ou nos baços para cada grupo. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados em relação ao grupo controle sem tratamento ($p > 0,05$). Glu IL-Sem-anal: antimoníato de meglumina intralesional administrado uma vez por semana; Glu IL-Quinzenal: antimoníato de meglumina intralesional administrado de 15 em 15 dias; Glu IL-IU: antimoníato de meglumina intralesional administrado em única infiltração; Controle: animais infectados e não tratados.

FONTE: Elaborado pelo autor.

Três animais morreram no decorrer do tempo de avaliação: 2 animais do grupo Controle e 1 animal do grupo Glu IL-IU, possivelmente em função do longo período de tempo que esses animais ficaram infectados.

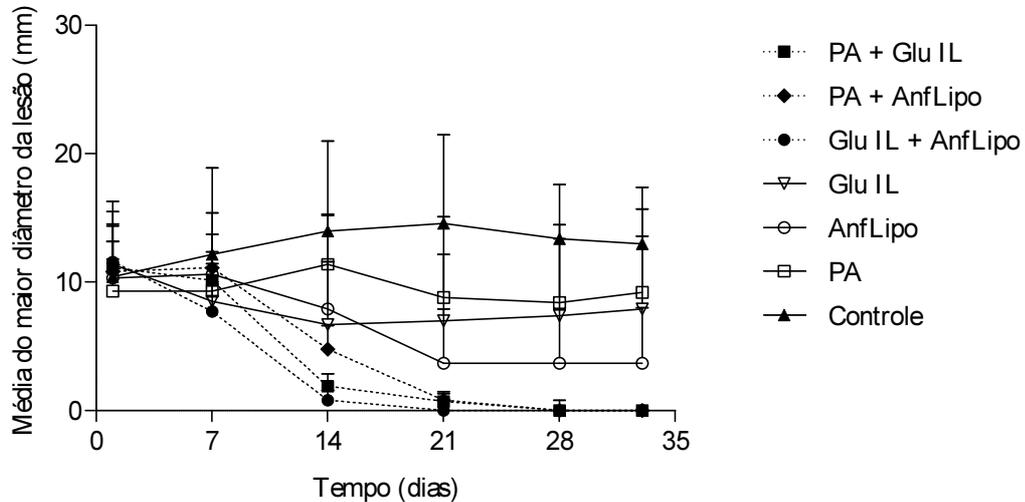
Mesmo com a perda de um animal do grupo Glu IL-IU, quando a toxicidade do medicamento foi avaliada através da mensuração da massa corpórea durante e após o tratamento, não houve diferença estatística significativa entre os grupos de animais tratados em relação ao controle sem tratamento ($p > 0,05$). Os animais em geral não apresentaram perda de peso e/ou manifestaram características que pudessem indicar efeito tóxico (pelo eriçado, agressividade, diarreia ou outros).

5.4 Estudo de combinação binária entre o gel de paromomicina, anfotericina B lipossomal intraperitoneal e antimoniato de meglumina intralesional em hamsters experimentalmente infectados com *L. (V.) braziliensis*

Eficácia clínica

Foi avaliada a redução do tamanho das lesões em função do tempo de cada esquema de tratamento. No Gráfico 9, é possível observar a redução do tamanho das lesões dos hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* nos grupos tratados. Diferença estatística significativa foi obtida a partir de D14 (14 dias após o início do tratamento) para os grupos PA+Glu IL e Glu IL+AnfLipo ($p < 0,05$). Aos 21 dias do início do tratamento (D21), a diferença desses grupos (PA+Glu IL e Glu IL+AnfLipo) se manteve e os grupos PA+AnfLipo e AnfLipo também passaram a apresentar diferença estatística significativa em relação ao controle sem tratamento ($p < 0,05$). Essa diferença permaneceu até o dia da eutanásia (D33). O grupo de animais tratados com o gel hidrofílico de paromomicina (PA) e o grupo Glu IL-IU apresentaram uma estagnação do tamanho da lesão de seus animais. As lesões dos animais do grupo controle sem tratamento se mantiveram em progressão, durante todo o período avaliado (GRÁFICO 9).

GRÁFICO 9 Tamanho médio das lesões de hamsters infectados *L. (V.) braziliensis* e tratados com gel hidrofílico de paromomicina tópico, anfotericina B lipossomal intraperitoneal ou antimoniato de meglumina intralesional



LEGENDA: Tamanho médio das lesões (mm) de hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos (n=4) infectados na base da cauda com 200 μ L de suspensão de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e tratados em diferentes esquemas com o gel hidrofílico de paromomicina tópico, anfotericina B lipossomal intraperitoneal e antimoniato de meglumina intralesional. As lesões foram medidas a cada sete dias e os animais sofreram eutanásia três dias após o fim do tratamento (D33). As barras verticais representam o desvio-padrão da média do maior diâmetro das lesões de cada grupo. Diferença estatística significativa foi obtida a partir de D14 (14 dias após o início do tratamento) para os grupos PA+Glu IL e Glu IL+AnfLipo ($p<0,05$). Aos 21 dias do início do tratamento (D21) também houve diferença estatística significativa em relação ao controle sem tratamento para os grupos PA+AnfLipo e AnfLipo ($p<0,05$). PA+Glu IL: Gel hidrofílico de paromomicina + antimoniato de meglumina intralesional administrado em única infiltração; PA+ AnfLipo: Gel hidrofílico de paromomicina + anfotericina B lipossomal 10 mg/kg dose única; Glu IL + AnfLipo: antimoniato de meglumina intralesional administrado em única infiltração + anfotericina B lipossomal 10 mg/kg dose única; Glu IL: antimoniato de meglumina intralesional administrado em única infiltração; AnfLipo: anfotericina B lipossomal 10 mg/kg dose única; Glu IL; PA: Gel hidrofílico de paromomicina; Controle: animais infectados e não tratados.
 FONTE: Elaborado pelo autor.

O percentual de redução do tamanho das lesões foi calculado no dia da eutanásia (D33) em comparação ao tempo inicial do tratamento (D1) e o percentual de cura completa dos animais (TABELA 4). Observa-se redução do tamanho das lesões de 100 % para os grupos de combinações de medicamentos: PA + Glu IL, PA + AnfLipo e Glu IL + AnfLipo. Esses grupos também apresentaram 100% (4/4) de cura completada lesão. Os grupos Glu IL, AnfLipo e PA apresentaram um percentual de redução de 50%, 72% e 29%, respectivamente. A cura da lesão dos animais desses grupos foi de 25% (Glu IL), 50% (AnfLipo) e 25% (PA). Não houve redução do tamanho das lesões dos animais e cura completa da lesão para o grupo controle sem tratamento (TABELA 4).

TABELA 4 Eficácia clínica de esquemas de tratamento utilizando o gel de paromomicina, anfotericina B lipossomal e antimoniato de meglumina intralesional em hamsters experimentalmente infectados com *L. (V.) braziliensis*

Esquemas de tratamento	Eficácia Clínica*	
	Redução no tamanho da lesão (%)	Cura completa da lesão (%)
PA + Glu IL	100,0	100,0
PA + AnfLipo	100,0	100,0
Glu IL + AnfLipo	100,0	100,0
Glu IL	50,0	25,0
AnfLipo	72,0	50,0
PA	29,0	25,0
Controle	0,0	0,0

* O tamanho médio das lesões foi calculado pelo maior diâmetro (mm).

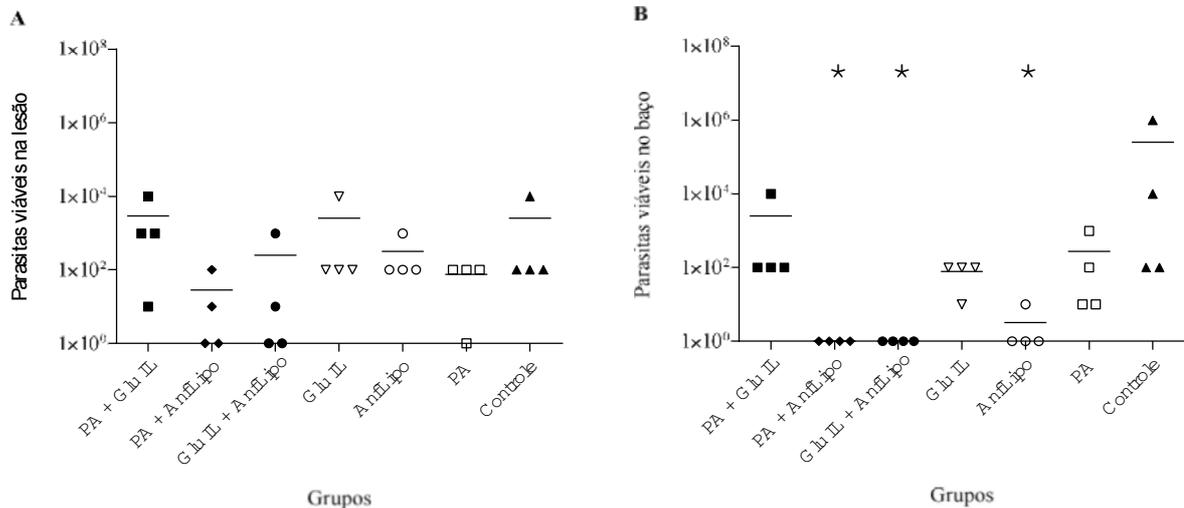
LEGENDA: O percentual de redução do tamanho médio das lesões e a cura completa foram obtidos considerando a relação entre os valores médios das lesões no tempo D1 (início do tratamento) e D33 (dia da eutanásia). PA+Glu IL: Gel hidrofílico de paromomicina + antimoniato de meglumina intralesional administrado em única infiltração; PA+ AnfLipo: Gel hidrofílico de paromomicina + anfotericina B lipossomal 10 mg/kg dose única; Glu IL + AnfLipo: antimoniato de meglumina intralesional administrado em única infiltração + anfotericina B lipossomal 10 mg/kg dose única; Glu IL: antimoniato de meglumina intralesional administrado em única infiltração; AnfLipo: anfotericina B lipossomal 10 mg/kg dose única; Glu IL; PA: Gel hidrofílico de paromomicina; Controle: animais infectados e não tratados.

FONTE: Elaborado pelo autor.

Eficácia parasitológica

Em relação à avaliação da carga parasitária, não houve diferença estatística significativa na lesão (A) em nenhum grupo tratado. No baço, os grupos de animais que receberam a dose única de 10 mg/kg de anfotericina B lipossomal isolada ou em combinação com o gel hidrofílico de paromomicina ou antimoniato de meglumina intralesional apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle sem tratamento (* $p < 0,05$) (GRÁFICO 10).

GRÁFICO 10 Parasitas viáveis na lesão e baço de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com gel hidrofílico de paromomicina tópico, anfotericina B lipossomal intraperitoneal ou antimoniato de meglumina intralesional



LEGENDA: Parasitas viáveis na lesão (A) e baço (B) de hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos (n=4) infectados na base da cauda com 200 μ L de suspensão de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e tratados em diferentes esquemas com o gel hidrofílico de paromomicina tópico, anfotericina B lipossomal intraperitoneal e antimoniato de meglumina intralesional. Os parasitas foram determinados através da técnica de diluição limitante no dia da eutanásia dos animais, D33 (33 dias do início do tratamento). As barras horizontais representam a média de parasitas viáveis nas lesões ou nos baços de cada grupo. Diferença estatística significativa em relação ao controle sem tratamento foi obtida na avaliação da carga parasitária do baço para os grupos PA+AnfLipo, Glu IL+AnfLipo e AnfLipo (* $p < 0,05$). PA+Glu IL: Gel hidrofílico de paromomicina + antimoniato de meglumina intralesional administrado em única infiltração; PA+ AnfLipo: Gel hidrofílico de paromomicina + anfotericina B lipossomal 10 mg/kg dose única; Glu IL + AnfLipo: antimoniato de meglumina intralesional administrado em única infiltração + anfotericina B lipossomal 10 mg/kg dose única; Glu IL: antimoniato de meglumina intralesional administrado em única infiltração; AnfLipo: anfotericina B lipossomal 10 mg/kg dose única; Glu IL; PA: Gel hidrofílico de paromomicina; Controle: animais infectados e não tratados. FONTE: Elaborado pelo autor.

A toxicidade dos medicamentos foi avaliada através da massa corpórea durante e após o tratamento. Os animais não tiveram perda de peso em nenhum momento da avaliação e nem manifestaram características que pudessem indicar efeito tóxico (pelo eriçado, agressividade, diarreia ou outros). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados e o grupo controle sem tratamento ($p > 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da leishmaniose cutânea no Brasil são administrados por via parenteral e causam efeitos adversos graves. Além disso, os tratamentos exigem serviço ambulatorial ou hospitalização do paciente e acompanhamento frequente através de exames laboratoriais, o que acaba por influenciar seus custos finais (ASSIS et al., 2017). Os estudos pré-clínicos são precursores na identificação de novos fármacos, desenvolvimento de formulações e combinação de medicamentos e têm contribuído para a avaliação de alternativas de tratamento para as leishmanioses (GONÇALVES et al., 2005; SEIFERT; CROFT, 2006; AGUIAR et al., 2009, AGUIAR et al., 2010; SEIFERT et al., 2011; de MORAIS-TEIXEIRA et al., 2014; de MORAIS-TEIXEIRA et al., 2015; REIMÃO et. al., 2016; TRINCONI et al., 2014; TRINCONI et al., 2016; TRINCONI et al., 2017).

Pensando na contribuição dos ensaios pré-clínicos para orientar ensaios clínicos, este trabalho avaliou esquemas de tratamento que podem ser mais eficazes, menos tóxicos, acessíveis aos pacientes e que requerem menor intervenção ambulatorial e hospitalar. Os ensaios consistiram na avaliação de protocolo de tratamento em monoterapia e em combinação binária entre o gel hidrofílico de paromomicina por via tópica, a anfotericina B lipossomal intraperitoneal em esquema de dose única ou doses intervalares pela via intraperitoneal e o antimoniato de meglumina intralesional.

6.1 Estudo da formulação do gel hidrofílico de paromomicina em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* e camundongos infectados com *L. (L.) major*

A tendência de redução moderada do tamanho médio das lesões de animais infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com o gel hidrofílico de paromomicina, observada neste estudo, foi anteriormente descrita. Resultados semelhantes de evolução de tamanho de lesão foram descritos em outros estudos de avaliação do gel hidrofílico da paromomicina formulado pela UFMG, em animais infectados com *L. (V.) braziliensis*, tratados durante 20 dias, administrado uma ou duas vezes ao dia (GONÇALVES et al., 2005; de MORAIS-TEIXEIRA et al., 2015). Além disso, não houve redução significativa de parasitas viáveis na lesão (local) e no baço

(sistêmica), na avaliação da carga parasitária. Estes resultados corroboram os observados no estudo de Moraes-Teixeira e colaboradores (2015).

Um único ensaio clínico avaliou o gel hidrofílico de paromomicina formulado pela UFMG em pacientes provavelmente infectados com *L. (V.) braziliensis*, em Corte de Pedras-BA. Dos 14 pacientes que chegaram ao final do estudo, 21% obtiveram cura completa; 50% melhora clínica e considerando os retratamentos, houve 72% de resultados satisfatórios. Neste estudo, foram registrados 29% de falha terapêutica (SANTOS et al. 2008). A melhora da taxa de eficácia do tratamento com o gel de paromomicina, só foi possível com o retratamento, o que sugere que a ação deste medicamento requer mais de 20 dias de tratamento. Possivelmente, no modelo animal, para uma melhor eficácia do gel de paromomicina também seja necessário tempo maior de exposição ao medicamento.

Ao contrário do observado para *L. (V.) braziliensis*, o gel hidrofílico de paromomicina formulado por Farmanguinhos-Fiocruz se mostrou muito ativo no tratamento de camundongos Balb/C infectados com *L. (L.) major*, com 100% dos animais apresentando cura clínica a partir de 28 dias após o início do tratamento. A escolha de dois modelos para a avaliação de atividade leishmanicida do gel hidrofílico de paromomicina formulado por Farmanguinhos-Fiocruz, se justificou, por *L. (V.) braziliensis* ser a principal espécie causadora de leishmaniose cutânea no Brasil e pela susceptibilidade terapêutica do modelo Balb/C - *L. (L.) major*. Estudos pré-clínicos, realizados com *L. (L.) major* vêm mostrando alta suscetibilidade ao tratamento com diferentes formulações de paromomicina tópica (NEAL et al., 1994; GROU et al., 1999; AGUIAR et al., 2009). A formulação do gel hidrofílico de paromomicina formulado pela UFMG, também mostrou alta eficácia contra *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis* (MUSSI et al. 2007).

Os ensaios clínicos realizados no Velho Mundo, com pacientes infectados por *L. (L.) major*, também apontam para alta sustentabilidade desta espécie a diferentes formulações tópicas de paromomicina, com taxas de cura que variaram de 72% a 94% (EL-ON et al., 1986; BRYCESON et al., 1994, BEN SALAH et al., 2009). A formulação de paromomicina a 15% + ureia 10%, administrada por 14 dias, não mostrou benefício clínico em relação ao placebo (BEN-SALAH et al., 1995; ASILIAN et al., 1995). Anos mais tarde, no entanto, ASILIAN et al. (2003) mostraram que a taxa de cura para este tratamento é dependente do tempo de

administração, sendo proposto pelos autores que o aumento do tempo de tratamento seria uma alternativa para melhorar a eficácia desta formulação.

O grupo de animais controle (de tratamento) do ensaio, tratados com antimoniato de meglumina (200 Sb^{+5} /kg/dia durante 20 dias), apresentou eficácia esperada de acordo com estudo anterior realizado pelo grupo de PCPP, do Instituto René Rachou, no qual todos os animais obtiveram cicatrização completa da lesão. De acordo com de Moraes-Teixeira e colaboradores (2015), doses mais baixas desse medicamento (20 ou 50 Sb^{+5} /kg/dia durante 20 dias consecutivos) não foram eficazes em reduzir o tamanho da lesão no modelo hamster (*Mesocricetus auratus*) infectado com *L. (V.) braziliensis*. A dose de antimoniato de meglumina de 200 Sb^{+5} /kg/dia também se mostrou eficaz em reduzir parasitas viáveis no baço. Os resultados estão de acordo com os obtidos por de Moraes-Teixeira e colaboradores (2015), e indicam robustez dos ensaios neste modelo animal.

6.2 Estudo de esquemas de tratamento intervalar e em dose única utilizando a anfotericina B lipossomal intraperitoneal em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*

Os estudos pré-clínicos e clínicos que avaliaram a eficácia da anfotericina B lipossomal para o tratamento leishmaniose cutânea não são conclusivos. O que motivou a avaliação da anfotericina B lipossomal em dose única para o tratamento da leishmaniose cutânea em animais infectados com *L. (V.) braziliensis*, foram os resultados de ensaios clínicos em pacientes portadores da leishmaniose visceral no Velho Mundo. Nesses estudos, os pacientes receberam doses únicas de 10 mg/kg ou 15 mg/kg, sendo obtidas taxas de cura de 96% a 98% (SUNDAR et al., 2010; MONDAL et al., 2014; SUNDAR et al., 2014). Porém com outros esquemas terapêuticos e regiões, esta eficácia não se confirmou. Na África Oriental, a anfotericina B lipossomal foi avaliada em dois esquemas: dose única de 7,5 mg/kg ou doses intervalares de 3 mg/kg/dia (dias 1 a 5, 14 e 21 – dose total 21 mg/kg), com eficácia de 85% e 40%, respectivamente. (KHALIL et al., 2014). Em Bangladesh, a anfotericina B lipossomal foi avaliada em esquemas de dose intervalar (3 doses de 5 mg/kg/dia), com taxa de cura de 96% (LUCERO et al., 2015).

Diante das variações de eficácia com os estudos clínicos de anfotericina B lipossomal em dose única e doses intervalares, optou-se por avaliar esquemas de dose única e intervalar, no

modelo experimental. Os resultados mostraram que o esquema de dose única (10 mg/kg) foi comparável com a mesma dose total, porém administrada em intervalos de cinco dias consecutivos (2 mg/kg/dia por 5 dias), tanto na redução do tamanho das lesões, quanto na redução de parasitas viáveis no baço. Os esquemas terapêuticos avaliados não produziram efeitos tóxicos nos animais. Não foi encontrado na literatura relato de avaliação da anfotericina B lipossomal em dose única para o tratamento da leishmaniose cutânea. No entanto, estudos clínicos realizados na Índia e em Bangladesh para o tratamento da leishmaniose visceral, observaram taxas finais de cura semelhantes com esquemas de dose única e intervalares, de 98% (dose única de 15 mg/kg) e de 96% (três doses intervalares de 5 mg/kg/dia - dose total de 15 mg/kg) (SUNDAR et al., 2014; LUCERO et al., 2015).

Não há ensaios pré-clínicos de avaliação da anfotericina B lipossomal em espécies causadoras de leishmaniose cutânea nas Américas. No Velho Mundo, é possível verificar a eficácia da anfotericina B lipossomal em animais experimentalmente infectados com *L. (L.) major* (YARDLEY; CROFT, 1997; YARDLEY; CROFT, 2000).

Na Américas, Solomon e colaboradores (2007) avaliaram a eficácia da anfotericina B lipossomal em sete pacientes portadores de leishmaniose cutânea por *L. (V.) braziliensis*. Os pacientes receberam a dose de 3 mg/kg/dia nos cinco primeiros dias de tratamento e uma sexta dose no 10º dia após início do tratamento. A taxa de cura foi de 100% na avaliação inicial (um mês do fim do tratamento) e até os 12 meses de acompanhamento, não foram observadas recidivas.

No Brasil, seis pacientes com leishmaniose mucosa sem resposta ao tratamento com antimoniato de meglumina, receberam a anfotericina B lipossomal na dose de 2 mg/kg/dia por período médio de 22 dias. Um paciente apresentou recidiva aos seis meses de acompanhamento e os outros cinco pacientes foram considerados clinicamente curados, após 26 a 38 meses de acompanhamento (SAMPAIO; MARSDEN, 1997). Outro estudo realizado no país também mostrou boa eficácia da anfotericina B lipossomal (em cinco pacientes portadores de leishmaniose mucosa com histórico de tratamento com o antimoniato de meglumina e contraindicação ao desoxicolato de anfotericina B. A taxa de cura foi de 100%, com tempo médio de cura de 102 dias. Não houve recorrência no período de acompanhamento do tratamento (7-14 meses) e nem necessidade de re-tratamento (AMATO

et al., 2007). Em outras avaliações no Brasil, com pacientes portadores de leishmaniose mucosa, a eficácia da anfotericina B lipossomal foi elevada, mesmo em pacientes portadores de HIV/AIDS (AMATO et al., 2011; ROCIO et al., 2014).

6.3 Estudo de definições de esquemas de tratamento utilizando antimoniato de meglumina por via intralesional em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*

O uso da via de administração intralesional em modelo animal infectado com leishmânia é pouco relatado. Travi; Martinez; Zea (1993) avaliaram hamsters infectados com *L. (V.) panamensis*, submetidos a tratamento com o antimoniato de meglumina por via intramuscular, intralesional e a combinação de ambos. Os autores concluíram que a melhor eficácia foi obtida com a combinação das vias intralesional e intramuscular com baixa dose de antimoniato de meglumina. Outro estudo, que visava a avaliação de quinolonas como tratamento leishmanicida, usou como controle o antimoniato de meglumina pela via intralesional em camundongos Balb/C infectados com *L. (L.) amazonensis*. Os animais receberam injeções de antimoniato de meglumina, via intralesional a cada cinco dias, tratamento que levou à redução de 96% da carga parasitária nas lesões dos animais (FOURNET et al., 1996).

Os estudos acima foram insuficientes em termos metodológicos para nortear um protocolo do uso do antimônio pentavalente pela via intralesional em modelo animal. No presente estudo, o tratamento com o esquema de infiltração única reduziu e estabilizou o tamanho das lesões até os 28 dias após a aplicação, mas deste ponto em diante houve reativação das lesões. A infiltração intralesional única, apesar de reduzir e estabilizar o tamanho das lesões, não foi capaz de curar as lesões até a avaliação final desse estudo. Entretanto, pela maior simplicidade, a aplicação única pode ser uma boa proposta para tratamentos de combinação.

O esquema de tratamento semanal proporcionou a cura clínica da lesão em 80%. Esse dado foi muito próximo ao observado no estudo clínico realizado pelo grupo, em pacientes portadores de leishmaniose cutânea, atendidos no Centro de Referência em Leishmaniose, IRR-Fiocruz, Belo Horizonte. Neste ensaio, foi avaliado o esquema semanal de tratamento com o antimoniato de meglumina intralesional, até a cicatrização da lesão ou até o máximo de oito aplicações. A taxa de cura obtida foi de 87% (RAMALHO et al., 2017). No estudo, foi

usada metodologia de infiltração validada por Silva e colaboradores (2017). Em relação ao esquema quinzenal de tratamento, foi obtida cura clínica em 100% dos animais. No Rio de Janeiro, o antimoniato de meglumina intralesional, administrado em intervalos de 15 dias em pacientes com leishmaniose cutânea, levou à taxa de cura final de 83% (VASCONCELLOS et al., 2012).

Apesar da eficácia clínica observada com o tratamento intralesional do antimoniato de meglumina nos animais infectados com *L. (V.) braziliensis*, eficácia parasitológica não foi obtida em nenhum dos esquemas avaliados. Os modelos animais permitem que se faça a avaliação parasitológica através da remoção e análise de seus órgãos e ou tecidos, o que gera informações complementares. Embora nos ensaios clínicos o parâmetro cura da lesão seja o desfecho de eficácia do tratamento, o parâmetro parasitológico dos ensaios pré-clínicos oferece uma informação a mais.

6.4 Estudo de combinação binária entre o gel de paromomicina, anfotericina B lipossomal intraperitoneal e antimoniato de meglumina intralesional em hamsters experimentalmente infectados com *L. (V.) braziliensis*

A terapia baseada na combinação de medicamentos quando comparada a regimes monoterápicos pode representar uma alternativa para o tratamento da leishmaniose cutânea, por retardar o surgimento de resistência, aumentar a eficácia do tratamento e reduzir efeitos adversos. O ensaio de combinações entre o gel hidrofílico de paromomicina, anfotericina B lipossomal em dose única e o antimoniato de meglumina intralesional por infiltração única foi proposto para avaliar esquemas simples e eficazes que possam orientar ensaios clínicos.

Todas as combinações avaliadas levaram à completa cicatrização das lesões em todos os animais; entretanto, as combinações (e também as monoterapias) não foram capazes de reduzir significativamente parasitas viáveis na lesão. A observação de cura clínica, mas não parasitológica, foi relatada em pacientes saudáveis anos após finalizarem o tratamento, indicando que apesar da cura clínica, o parasita pode persistir no organismo (SCHUBACH et al., 1998a; SCHUBACH et al., 1998b; MENDONÇA et al., 2004).

No ensaio de combinações, o tratamento com a dose única de anfotericina B lipossomal (10 mg/kg) curou 50% das lesões. Esse percentual não foi obtido no estudo de avaliação de esquemas dose única e intervalar da anfotericina B lipossomal, nos quais, nenhum animal tratado com dose única apresentou cura completa da lesão. É provável que essa diferença esteja relacionada à maior carga parasitária (10^4 a 10^6) encontrada no grupo sem tratamento do ensaio de avaliação de esquemas dose única e intervalar em comparação ao estudo de combinação entre medicamentos (10^2 a 10^4). Resultados semelhantes foram observados para os grupos tratados com antimoniato de meglumina intralesional e gel hidrofílico de paromomicina. No entanto, apenas para anfotericina B lipossomal houve redução significativa do tamanho da lesão, nos dois ensaios.

Em relação à eficácia parasitológica no baço, somente nos esquemas que incluíram anfotericina B lipossomal (combinação ou em monoterapia) ocorreu redução significativa de parasitas viáveis. A combinação entre o gel hidrofílico de paromomicina tópica e o antimoniato de meglumina intralesional infiltração única, não foi capaz de levar à redução significativa de parasitas no baço. Entretanto, a avaliação da combinação entre o gel hidrofílico de paromomicina tópico com subdose de antimoniato de meglumina administrado pela via intraperitoneal (20 dias de tratamento) mostrou redução significativa de parasitas viáveis no baço (de MORAIS-TEIXEIRA et al., 2015). Assim, em modelo experimental, a via de administração sistêmica do antimoniato de meglumina parece favorecer a redução de parasitas no baço. A possibilidade de reduzir doses de medicamentos sistêmicos e associar essas baixas doses a medicamento de uso tópico, como o gel hidrofílico de paromomicina, pode significar ganho para o tratamento da leishmaniose cutânea, pela capacidade de reduzir os efeitos adversos e promover sinergia.

O sinergismo entre a paromomicina, tanto com o antimoniato de meglumina, quanto com a anfotericina B, foi observado em ensaio *in vitro* de amastigota intracelular em macrófagos murinos infectados com *L. (V.) braziliensis* (de MORAIS-TEIXEIRA et al., 2014). Na avaliação das combinações do presente estudo também foi verificada melhora da eficácia clínica dos animais infectados com *L. (V.) braziliensis*.

Uma série de estudos anteriores mostram melhor eficácia quando o gel hidrofílico de paromomicina formulado pela UFMG foi combinado a outros medicamentos leishmanicidas.

Gonçalves e colaboradores (2005) mostraram que combinação entre o gel hidrofílico de paromomicina e baixa dose de antimoniato de meglumina foi mais eficaz em reduzir o tamanho das lesões do que os medicamentos em uso único, em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Em outros estudos, o tratamento combinado de miltefosina oral e gel hidrofílico de paromomicina formulado pela UFMG em animais infectados com *L. (L.) major* ou *L. (L.) amazonensis* induziu significativa redução do tamanho da lesão e carga parasitária (AGUIAR et al., 2009; AGUIAR et al., 2010).

O tratamento com a formulação do gel hidrofílico de paromomicina formulado por Farmanguinhos-Fiocruz não causou irritação na pele dos animais e não foram observados sinais de toxicidade. Diferente do observado em ensaio clínico, realizado na Colômbia, com pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) guyanensis*, tratados com combinação de pomada de paromomicina/cloreto de metil-benzetônio tópica e antimoniato de meglumina administrado em curto período de tempo (20 mg Sb^{+5} kg/dia durante 7 dias). Os efeitos adversos relatados foram ardor, formação de bolhas e inflamação no local da aplicação (SOTO et al., 1995). As reações locais com esta formulação já foram atribuídas à presença do cloreto de metil-benzetônio (EL-ON et al., 1986; EL-ON et al., 1992).

Dentre as combinações, a administração binária entre o gel de paromomicina tópico e o antimoniato de meglumina intralesional apresenta potenciais vantagens visando futuros ensaios clínicos. Esses poderão subsidiar novas opções terapêuticas frente às terapias sistêmicas preconizadas, que são associadas à alta frequência de efeitos adversos (OLIVEIRA et al., 2011). A possibilidade de um tratamento tópico com paromomicina em regime domiciliar conduzido pelo paciente, combinado a única intervenção ambulatorial, pela administração do antimoniato de meglumina intralesional, possui vantagens em relação às opções terapêuticas atualmente disponíveis, por ser mais confortável para o paciente e não requerer internação. Outra vantagem é o uso de doses mais baixas do antimoniato de meglumina, possível pelo tratamento intralesional, que em teoria, poderá reduzir sua toxicidade, representando menos eventos adversos ao paciente (RAMALHO et al., 2017).

A anfotericina B lipossomal, devido a algumas especificidades, como longo tempo de infusão, é administrada apenas em ambiente hospitalar, exigindo completa monitorização de eventos adversos (SOLOMOM et al., 2007). As outras duas combinações avaliadas neste

estudo (PA+AnfB Lipo e AnfB Lipo + Glu IL) envolvem a anfotericina B lipossomal e, em uma perspectiva clínica, ainda exigiriam que o tratamento fosse realizado em regime de internção. No entanto, com a possibilidade de uso de uma única dose desse medicamento, o tempo de hospitalização do paciente seria certamente menor quando comparado ao esquema terapêutico para anfotericina B lipossomal atualmente recomendado pelo Ministério de Saúde. A anfotericina B lipossomal é um medicamento reconhecido por sua elevada eficácia associada à redução dos efeitos adversos, possível pela encapsulação do fármaco em lipossomas que são direcionados aos órgãos alvos da leishmaniose (VYAS; GUPTA, 2006). A possibilidade de combinação de dose única de anfotericina B lipossomal combinada com o gel de paromomicina ou o antimoniato de meglumina intralesional levou a resultados satisfatórios em avaliação pré-clínica e pode servir de orientação para ensaios clínicos futuros, ampliando as possibilidades de esquemas de tratamento e assim abrangendo todos os grupos de pacientes.

7 CONCLUSÕES

- O gel hidrofílico de paromomicina se mostrou eficaz no tratamento de lesões de animais experimentalmente infectados com *L. (L.) major* e eficácia moderada em infecção por *L. (V.) braziliensis*;
- O tratamento realizado com anfotericina B lipossomal por via intraperitoneal em dose única possui a mesma eficácia quanto a mesma dose, administrada em cinco dias consecutivos;
- O tratamento com antimoniato de meglumina administrado por infiltração intralesional semanal ou quinzenal é eficaz no tratamento de animais infectados por *L. (V.) braziliensis*. A infiltração intralesional única, apesar de reduzir o tamanho das lesões, não foi capaz de eliminar parasitas da lesão;
- As combinações binárias entre o gel hidrofílico de paromomicina, anfotericina B lipossomal via intraperitoneal e antimoniato de meglumina intralesional representam alternativa para o tratamento da leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) braziliensis* e encorajam futuros ensaios clínicos.

REFERÊNCIAS

ACHTERBERG, V.; GERCKEN, G. Metabolism of ether lysophospholipids in *Leishmania donovani* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 26, n. 3, p. 277-287, 1987.

AGUIAR, M. G. et al. Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) major* leads to reduction in both lesion size and systemic parasite burdens. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 64, n. 6, p. 1234-1240, 2009.

AGUIAR, M. G. et al. Reductions in skin and systemic parasite burdens as a combined effect of topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 11, p. 4699-4704, 2010.

AMATO, V. S. et al. Treatment of mucosal leishmaniasis with a lipid formulation of amphotericin B. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, n. 2, p. 311-312, 2007.

AMATO, V. S. et al. Can we use a lower dose of liposomal amphotericin B for the treatment of mucosal American leishmaniasis? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, n. 5, p. 818-819, 2011.

ARANA, B.A. et al. Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 5, p. 466-470, 2001.

ASILIAN, A. et al. A randomized, placebo-controlled trial of a two-week regimen of aminosidine (paromomycin) ointment for treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n. 6, p. 648-651, 1995.

ASILIAN, A. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with aminosidine (paromomycin) ointment: double-blind, randomized trial in the Islamic Republic of Iran. **Bull. World Health Organ.**, v. 81, n. 5, p. 353-359, 2003.

ASSIS, T. S. M. et al. The direct costs of treating human visceral leishmaniasis in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 50, n. 4, p. 478-482, 2017.

BÁFICA, A. et al. American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifiline. **Int. J. Dermatol.**, v. 42, n. 3, p. 203-207, 2003.

BALANÑA-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BEN SALAH, A. et al. A randomized, placebo-controlled trial in Tunisia treating cutaneous leishmaniasis with paromomycin ointment. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n. 2, p. 162-166, 1995.

_____. WR279, 396, a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis: a phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, n. 5, p. e432, 2009.

_____. Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. **Neagl. J. Med.**, v. 368, n. 6, p. 1191, 2013.

BERMAN, J. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Rev. Infect. Dis.**, v. 10, n. 3, p. 560-586, 1988.

BERMAN, J. Clinical status of agents being developed for leishmaniasis. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 14, n. 11, p. 1337-1346, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Relatório de Recomendação: Miltefosina para o tratamento de leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

_____. ANVISA- Instrução Normativa Anvisa Nº 2, de 30 de Março de 2009. Guia para Notificação de Lotes-Piloto de Medicamentos , 2016 .

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Editora do Ministério da Saúde 2017a.

_____. DATASUS. Disponível em: < <http://datasus.saude.gov.br> >. Acesso em: 18 Jun. 2017b.

BRITO, G. et al. Clinical and immunological outcome in cutaneous leishmaniasis patients treated with pentoxifylline. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, n. 4, p. 617-620, 2014.

BRITO, G. et al. Oral Pentoxifylline Associated with Pentavalent Antimony: A Randomized Trial for Cutaneous Leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 96, n. 5, p. 1155-1159, 2017.

BRITO N.C., RABELLO A., COTA G.F. Efficacy of pentavalent antimoniate intralesional infiltration therapy for cutaneous leishmaniasis: A systematic review. **PLoS One**. v. 12,n. 9,p, e0184777, 2017

BRYCESON, A. D.; MURPHY, A.; MOODY, A. H. Treatment of 'Old World' cutaneous leishmaniasis with aminosidine ointment: results of an open study in London. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, n. 2, p. 226-228, 1994.

CARNEIRO, G. et al. Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 9, n. 9, p. 1083-1097, 2012.

CARNIELLI, J. B. et al. Proteomic analysis of the soluble proteomes of miltefosine-sensitive and -resistant Leishmaniainfantumchagasi isolates obtained from Brazilian patients with different treatment outcomes. **J Proteomics**, v. 108, p. 198-208, 2014.

CARTER, K. C; ALEXANDER, J. Studies on the topical treatment o experimental cutaneous leishmaniasis: the therapeutic effect of methyl benzethonium chloride and the aminoglycosides, gentamicin and paromomycin. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 83, n. 3, p. 233-239, 1989.

CASTRO, M. D. et al. Pharmacokinetics of Miltefosine in Children and Adults with Cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 61, n. 3, p. e02198-16, 2017.

CHRUSCIAK-TALHARI, A. 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.**, v. 84, n. 2, p. 255-260, 2011.

CLINICAL TRIALS. Disponível em: <<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=leishmaniasis+and+Brazil&Search=Searchhtt>>. Acesso em: 02 fev. 2018.

COELHO, A. C. et al. In vitro and in vivo miltefosine susceptibility of a *Leishmania amazonensis* isolate from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 7, p. e2999, 2014.

COTA, G. F. et al. The Cure Rate after Placebo or No Therapy in American Cutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149697, 2016.

CROFT, S. L. et al. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, n. 16, p. 2633-2636, 1987.

CUNHA M. A. et al. Efficacy and Safety of Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Mucosal Leishmaniasis from the New World: A Retrospective Study. **Am J Trop Med Hyg.** v. 93, n. 6, p. 1214-8, 2015.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 117-118, 2006.

DASTGHEIB, L.; NASERI, M.; MIRASHE, Z. Both combined oral azithromycin plus allopurinol and intramuscular Glucantime yield low efficacy in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a randomized controlled clinical trial. **Int. J. Dermatol.**, v. 51, n. 12, p. 1508-1511, 2012.

de MORAIS-TEIXEIRA E. et al. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 475-478, 2011.

_____. In vitro interaction between paromomycin sulphate and four drugs with leishmanicidal activity against three New World *Leishmania* species. **J. Antimicrob Chemother**, v.69, n.1, 2014.

_____. Combined suboptimal schedules of topical paromomycin, meglumine antimoniate and miltefosine to treat experimental infection caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 70, n. 12, p. 3283-3290, 2015.

DONOVICK, R. et al. Amphotericin A and B, antifungal antibiotic produced by a streptomycete: I in vitro studies. **Antibiot. Ann.**, v. 3, p. 579-586, 1955-1956.

EL-ON, J.; GREENBLATT, C. L. An *in vitro* model for testing the effect of antileishmanial drugs of possible use in topical treatment. **Curr. Ther. Res.**, v. 33, p.660-669, 1983.

EL-ON, J. et al. Development of topical treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 26, p.745-751, 1984.

_____. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 87, n. 2, p. 284-288, 1986.

_____. Topical treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*: a double-blind control study. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 27, n. 2 Pt 1, p. 227-231, 1992.

EL-ON, J.; JACOBS, G. P.; WEINRAUCH, L. Topical chemotherapy of cutaneous leishmaniasis. **Parasitol. Today**, v. 4, p.76-81, 1988.

EL-SAYED, M.; ANWAR, A. E. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 24, n. 3, p. 335-340, 2010.

ESCOBAR, P. et al. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH (3) (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Trop.**, v. 81, n. 2, p. 151-157, 2002.

FARAJZADEH, S. et al. Comparison between Combination Therapy of Oral Terbinafine and Cryotherapy versus Systemic Meglumine Antimoniate and Cryotherapy in Cutaneous Leishmaniasis: A Randomized Clinical Trial. **Iran. J. Parasitol.**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2015.

FOURNET, A. et al. *In vivo* efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, n. 11, p. 2447-2451, 1996.

GADELHA, A. D. R. et al., Tratamento da leishmaniose tegumentar americana com injeções intralesionais de n-metil-glucamina. **An. Bras. dermatol.**, v. 65, n. 4, p. 201-203, 1990.

GADELHA, E. P. et al. Efficacy and safety of a single dose pentamidine (7mg/kg) for patients with cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis*: a pilot study. **An. Bras. Dermatol.**, v. 90, n. 6, p. 807-813, 2015.

GARCIA BUSTOS, M. F. et al. Miltefosine versus meglumine antimoniate in the treatment of mucosal leishmaniasis. **Medicina**, v. 74, n. 5, p. 371-377, 2014a.

GARCIA BUSTOS, M. F. et al. *In vivo* antileishmanial efficacy of miltefosine against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **J. Parasitol.**, v. 100, n. 6, p. 840-847, 2014b.

- GONÇALVES, G. S. et al. Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Acta Trop.**, v. 93, n. 2, p. 161-167, 2005.
- GONZÁLEZ, U. et al. Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database Syst Rev.**, n. 4, 2008.
- GRIENSVEN, J. et al. Combinationtherapy for visceral leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.**, v. 10, p. 184-194, 2010.
- GROL, M. et al. Successful topical treatment of murine cutaneous Leishmaniasis with a combination of paromomycin (aminosidine) and gentamicin. **J. Parasitol.**, v. 85, p. 354-359, 1999.
- HERRMANN, H. O.; GERCKEN, G. Metabolism of 1-0-[1'-14C]octadecyl-sn-glycerol in *Leishmania donovani* promastigotes. Ether lipid synthesis and degradation of the ether bond. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 5, n. 2, p. 65-76, 1982.
- HU, R. V. et al. Randomized single-blinded non-inferiority trial of 7 mg/kg pentamidine isethionate versus 4 mg/kg pentamidine isethionate for cutaneous leishmaniasis in Suriname. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n.3, p. e0003592, 2015.
- JAFFARY, F. et al. A Comparison between the Effects of Glucantime, Topical Trichloroacetic Acid 50% plus Glucantime, and Fractional Carbon Dioxide Laser plus Glucantime on Cutaneous Leishmaniasis Lesions. **Dermatol. Res. Pract.**, v. 2016, 2016.
- KHALIL, E. A. et al. Safety and efficacy of single dose versus multiple doses of AmBisome for treatment of visceral leishmaniasis ineastern Africa: a randomized trial. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 1, p. e2613, 2014.
- KRAUSE, G.; KROEGER, A. Topical paromomycin/methylbenzethonium chloride plus parenteral meglumine antimonate as treatment of American cutaneous leishmaniasis: controlled study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 29, n. 2, p. 466- 467, 1999.
- KRAUSE, G.; KROEGER, A. Topical treatment of American cutaneous leishmaniasis with paramomycin and methylbenzethonium chloride: a clinical study under field conditions in Ecuador. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, n. 1, p. 92-94, 1994.
- LAINSON, R. et al. Leishmania and leishmaniasis. **Inst. Evandro Chagas**, v. 1, p. 83-124, 1986.
- LUCERO, E. et al. Effectiveness and safety of short course liposomal amphotericin B (AmBisome) as first line treatment for visceral leishmaniasis in Bangladesh. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 4, p. e0003699, 2015.
- MACHADO, P. R. et al. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, n. 6, p. 788-793, 2007.
- MACHADO, P. R. et al. Treatment of Disseminated Leishmaniasis with Liposomal Amphotericin B. **Clin. Infect. Dis.**, v.61, n.6, 2015.

- MAURICIO, I. L. et al. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, n. 03, p. 237-246, 1999.
- MENDONÇA, M. G. et al. Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? **J. Infect. Dis.**, v. 189, n. 6, p. 1018-1023, 2004.
- MESQUITA, J. T.; TEMPONE, A. G.; REIMÃO, J. Q. Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime®, miltefosine and sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) infantum* intracellular amastigotes. **Acta Trop.**, v. 130, p.112-116, 2014.
- MOHEBALI, M. et al. Comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) by a randomized clinical trial in Iran. **Acta Trop.** v. 103, n. 1, p. 33-40, 2007.
- MONDAL, D. et al. Efficacy and safety of single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in a rural public hospital in Bangladesh: a feasibility study. **Lancet. Glob. Health.**, v. 2, n. 1, p. e51-57, 2014.
- MOTTA, J. O.; SAMPAIO, R. N. A pilot study comparing low-dose liposomal amphotericin B with N-methyl glucamine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 26, n. 3, p. 331-335, 2012.
- MULLEN, A. B.; CARTER, K. C.; BAILLIE, A. J. Comparison of the efficacies of various formulations of Amphotericin B against murine visceral leishmaniasis. **Antimicrob. Agent. Chemother**, v. 41, n. 10, p. 2089-2092, 1997.
- MUSSI, S. V.; FERNANDES, A. P.; FERREIRA, L. A. Comparative study of the efficacy of formulations containing fluconazole or paromomycin for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) major* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitol. Res.**, v. 100, n. 6, p. 1221-1226, 2007.
- NEAL, R. A. The effect of antibiotics of the neomycin group on experimental cutaneous leishmaniasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.62, n.1, p. 54-62, 1968.
- NEAL, R. A. et al. Aminosidine ointments for the treatment of experimental cutaneous. **Trans Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, p. 223-235, 1994.
- NÉSTOR, S. et al. Randomized, Double-Blinded, Phase 2 Trial of WR 279,396 (Paromomycin and Gentamicin) for Cutaneous Leishmaniasis in Panama. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, n. 3, p. 557-563, 1968.
- NEVES, L. O. et al. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, n. 6, p. 1092-1101, 2011.
- OLIVEIRA-NETO, M. P. et al 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.**, v. 45, n. 6, p. 496-499, 1997a.

_____. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 57, n. 6, p.651-655, 1997b.

_____. Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil—an area of *Leishmania (V.) braziliensis* transmission. **Int. J. Dermatol.**, v. 36, n. 6, p. 464-468, 1997c.

OLIVEIRA, L.F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Trop.**, v. 118, n. 2. p. 87-96. 2011.

PAHO/WHO – Leishmaniasis. Epidemiological Report in the Americas Pan American Health Organization. Disponível em: < www.paho.org/leishmaniasis > Acesso em: 18 Jun.

RAMALHO, D.B. Estudo clínico para avaliação da eficácia e segurança do uso intralesional de antimoniatado de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea localizada. **Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva.** Instituto René Rachou. Minas Gerais, 2017.

RAVIS, W. R. et al. Pharmacokinetics and absorption of paromomycin and gentamicin from topical creams used to treat cutaneous leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.57, n.10, 2013.

REIMÃO, J. Q. et al. Investigation of Calcium Channel Blockers as Antiprotozoal Agents and Their Interference in the Metabolism of *Leishmania (L.) infantum*. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 2016, 2016.

REVEIZ, L. et al. Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61843, 2013.

ROBERT, A.; BRIGGAMAN, M. D. The aromatic diamidines. **Int. J. Dermatol.**, v. 16, n. 3, p. 155-162, 1977.

ROBLEDO, S. M. et al. Efficacy and tolerance of pentamidine for treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. (V.) panamensis* in Colombia. **Biomedica**, Suppl 1, p. 188-193, 2006.

ROCIO, C. et al. Liposomal formulation of amphotericin B for the treatment of mucosal leishmaniasis in HIV-negative patients. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.108, n.3, p. 176-178, 2014.

ROMERO, G. A. et al. 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.**, v. 65, n. 5, p. 456-465, 2001.

ROMERO, G. A. et al. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 6, p. e0005706, 2017.

- ROUSSEL, M. et al. Comparison between one and two injections of pentamidine isethionate, at 7 mg/kg in each injection, in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 100, n. 4, p. 307-314, 2006.
- RUBIANO, L. C. et al. Noninferiority of miltefosine versus meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis in children. **J. Infect. Dis.**, v. 205, n. 4, p. 684-692, 2012.
- RUIZ, H. K. et al. New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and *Leishmania* spp. **Int. J. Pharm.**, v. 473, n. 1-2, p. 148-157, 2014.
- SADEGHIAN, G.; NILFOROUSHZADEH, M.A. Effect of combination therapy with systemic glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Int J Dermatol.**, v. 45, n. 7, p. 819-821, 2006.
- SAHA, A. K.; MUKHERJEE, J.; BRADIERE, A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 19, p. 195-200, 1986.
- SAMPAIO, R. N. R.; MARSDEN, P. D. Tratamento da forma mucosa de leishmaniose sem resposta a glucantime, com anfotericina B liposomal. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, vol. 30, n. 2, p. 125-128, 1997.
- SANTAREM, A. A. et al. Effectiveness of miltefosine-pentoxifylline compared to miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in C57Bl/6 mice. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 47, n. 4, p. 517-520, 2014.
- SANTOS J. B. et al.. Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous Leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **J Infect Dis.** v. 190, n. 10, p. 1793-6, 2004.
- SANTOS, A. M. et al. Efeito de uma formulação hidrofílica de paromomicina tópica na leishmaniose cutânea em pacientes com contra-indicações de tratamento com antimônio pentavalente. **Rev. Soc. Bras Med Trop.**, v. 41, p. 444-448, 2008.
- SANTOS, C. M. et al. Amphotericin B-loaded nanocarriers for topical treatment of cutaneous leishmaniasis: development, characterization, and in vitro skin permeation studies. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 8, n. 2, p. 322-329, 2012.
- SEIFERT, K. et al. *In vitro* interactions between sitamaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine, paromomycin and pentamidine against *Leishmania donovani*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 66, n. 4, p. 850-854, 2011.
- SEIFERT, K.; CROFT, S. L. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosin and other antileishmanial drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 1, p. 73-79, 2006.
- SHANEHSAZ, S. M.; ISHKHANIAN, S. A comparative study between the efficacy of oral cimetidine and low-dose systemic meglumine antimoniate (MA) with a standard dose of systemic MA in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Dermatol.**, v. 54, n. 7, p. 834-838, 2015.

SCHUBACH A. et al. Detection of Leishmania DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **J Infect Dis.** v.178, n. 3, p. 911-4, 1998a.

SCHUBACH A. et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of Leishmania (Viannia) braziliensis persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **Am J Trop Med Hyg.** v.58, n. 6, p. 824-7, 1998b.

SILVA, R. E. D. et al. Intralesional meglumine antimoniate for the treatment of localised cutaneous leishmaniasis: a retrospective review of a Brazilian referral centre. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 111, n. 8, p. 512-516, 2016.

SILVA, R. E. D. et al. Towards a standard protocol for antimony intralesional infiltration technique for cutaneous leishmaniasis treatment. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v.113, n. 2, p. 71-79, 2017.

SOLOMON, M. et al. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to Leishmania braziliensis. **J Am Acad Dermatol.** v. 56, n. 4, p. 612-6, 2007.

SOLOMON, M. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with intralesional sodium stibogluconate. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.** v. 23, n. 10, p. 1189-1192, 2009.

SOLOMON M. et al. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for Leishmania braziliensis cutaneous leishmaniasis in travelers. **J Am Acad Dermatol.** v. 68, n. 2, p. 284-9, 2012.

SOTO, J. et al. Successful treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis with four injections of pentamidine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 50, n. 1, p. 107-111, 1994.

_____. Successful treatment of New World cutaneous leishmaniasis with a combination of topical paromomycin/methylbenzethonium chloride and injectable meglumine antimoniate. **Clin. Infect. Dis.,** v. 20, n. 1, p. 47-51, 1995.

_____. Topical paromomycin/methylbenzethonium chloride plus parenteral meglumine antimoniate as treatment for American cutaneous leishmaniasis: controlled study. **Clin. Infect. Dis.,** v. 26, n. 1, p. 56-58, 1998.

_____. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. **Clin Infect Dis.** v. 33, n 7, p. 57-61, 2001.

_____. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.,** v. 38, n. 9, p. 1266-1272, 2004.

SOTO, J.; BERMAN, J. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.,** p. S34-40, 2006.

SOTO J. et al. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med.** v. 78, n. 2, p. 210-1, 2008.

_____. Efficacy of extended (six weeks) treatment with miltefosine for mucosal leishmaniasis in Bolivia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 3, p. 387-389, 2009.

SUNDAR, S. et al. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. **N. Engl. J. Med.**, v. 362, n. 6, p. 504-512, 2010.

_____. Efficacy and safety of amphotericin B emulsion versus liposomal formulation in Indian patients with visceral leishmaniasis: a randomized, open-label study. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 9, p. e3169, 2014.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 17, n. 5, 2008.

_____. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 14, n. 1, p. 53-63, 2013.

TITUS, R.G. et al. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunol.**, v. 7, n. 5, p. 545-555, 1985.

TRAVI, B. L.; MARTINEZ, J. E.; ZEA, A. Antimonial treatment of hamsters infected with *Leishmania (Viannia) panamensis*: assessment of parasitological cure with different therapeutic schedules. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, n. 5, p. 567-569, 1993.

TRINCONI, C. T. et al. Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 5, p. 2608-2613, 2014.

_____. Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 71, n. 5, p. 1314-1322, 2016.

_____. Topical tamoxifen in the therapy of cutaneous leishmaniasis. **Parasitology**, p. 1-7, 2017.

VASCONCELLOS, EDE. C. et al. Intralesional meglumine antimoniate for treatment of cutaneous leishmaniasis patients with contraindication to systemic therapy from Rio de Janeiro (2000 to 2006). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.87, n.2, p. 257-260, 2012.

VÉLEZ, I. et al. Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, n. 2, p. 351-356, 2010.

VYAS, S.P.; GUPTA, S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. **Int. J. Nanomedicine**, v. 1, p. 417-432, 2006

WEINRAUCH, L. et al. Topical treatment of New World cutaneous leishmaniasis in Belize: a clinical study. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 29, n. 3, p. 443-446, 1993.

WHO. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases: World Health Organization, 2010.

_____. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> r >. Acesso em: 18 jun. 2017.

_____. Leishmaniasis Epidemiological Situation. 2018. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> >. Acesso em: 27 Jan. 2018.

WORTMANN, G. et al. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, n. 5, p. 1028–1033, 2010.

YARDLEY, V.; CROFT, S. L. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 13, n. 4, p. 243-248, 2000.

_____. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 4, p. 752-756, 1997.

ZAULI-NASCIMENTO, R. C. et al. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Trop. Med. Int. Health**, v.15, n. 1, p. 68-76, 2010.

ANEXO 1

Licença do Comitê de Ética no Uso de Animais



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo CruzVice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de ReferênciaComissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-6/13

Certificamos que o protocolo (P-36/12-2), intitulado "Avaliação in vitro e in vivo de alternativas de tratamento para espécies de Leishmania sp. de importância nosológica", sob a responsabilidade de ANA LUCIA TELES RABELLO, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 03/12/2016 e inclui o uso total de :

Mesocricetus auratus

- 1000 Machos de Golden, Peso: 80,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 200 Machos de BALB/c, Peso: 20,0000 Grama(s).

- 1400 Fêmeas de BALB/c, Peso: 20,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 3 de dezembro de 2012

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550