

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Avaliação da atividade *in vivo* do antimoniato de meglumina e
de sua associação com o tratamento tópico sobre
Leishmania (Viannia) braziliensis isoladas de pacientes
portadores de leishmaniose cutânea**

por

Lucas Fonseca Rodrigues

Belo Horizonte
Fevereiro de 2012

DISSERTAÇÃO MDIP-CPqRR

L. F. RODRIGUES

2012

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Avaliação da atividade *in vivo* do antimoniato de meglumina e
de sua associação com o tratamento tópico sobre
Leishmania (Viannia) braziliensis isoladas de pacientes
portadores de leishmaniose cutânea**

por

Lucas Fonseca Rodrigues

**Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde na área de
concentração de Doenças Infecciosas e
Parasitárias.**

Orientação: Dra. Ana Rabello

**Belo Horizonte
Fevereiro de 2012**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

R696a
2012

Rodrigues, Lucas Fonseca.

Avaliação da atividade *in vivo* do antimoniato de meglumina e de sua associação com o tratamento tópico sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea / Lucas Fonseca Rodrigues. – Belo Horizonte, 2012.

XVIII, 73 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 82 - 91

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose cutânea/quimioterapia 2. *Leishmania braziliensis*/parasitologia 3. Resistência a medicamentos/efeitos de drogas 4. Combinação de medicamentos. III. Rabello, Ana Lúcia Teles (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Avaliação da atividade *in vivo* do antimoniato de meglumina e
de sua associação com o tratamento tópico sobre
Leishmania (Viannia) braziliensis isoladas de pacientes
portadores de leishmaniose cutânea**

por

Lucas Fonseca Rodrigues

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Ana Lúcia Teles Rabello (Presidente)

Prof. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes

Prof. Dr. Frederic Jean Georges Frezard

Suplente: Prof. Dra. Betânia Barros Cota

Dissertação defendida e aprovada em: 28/02/2012.

COLABORADORES

Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ/MG

Dra. Eliane de Morais Teixeira

Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira

Dra. Marta Marques Gontijo de Aguiar

SUPORTE FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Edital nº70/2009)

Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

“[Eu] Pensava que nós seguíamos caminhos já feitos, mas parece que não os há.
O nosso ir faz o caminho”.

C. S. Lewis

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus, fonte de todos os meus dons e conquistas.

À minha família, alicerce de toda uma vida.

Aos amigos, família que escolhi, pela presença, mesmo na minha ausência.

À Ana Rabello, pela confiança, por ter sido muito mais que orientadora e por ter tentado tornar essa etapa mais leve, sempre.

À Eliane Teixeira, por tudo que me ensinou, pelas contribuições no trabalho e por sempre acreditar no meu potencial.

À Professora Ana Paula Fernandes, por ter aberto as portas para que eu trilhasse o caminho da Ciência.

A todos os colaboradores do Laboratório de Pesquisas Clínicas e do Centro de Referência em Leishmanioses, pelo companherismo e pela agradável convivência de todos os dias.

Ao Professor Lucas Miranda e à Marta Gontijo, pelo preparo do gel de paromomicina.

À Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz, pela caracterização dos isolados.

Ao CPqRR, por proporcionar a infra-estrutura necessária para execução de trabalhos científicos de altíssimo nível.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que se importam com o próximo, que compartilham ideias e àqueles que contribuem para a melhoria da saúde pública, pela inspiração.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVI
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana – Aspectos Gerais	19
1.2 Terapêutica da Leishmaniose Tegumentar Americana	21
1.3 A Problemática da Resistência nas Leishmanioses	23
1.4 A Adequação dos Modelos para Estudos de Resistência a Drogas.....	26
1.5 Tratamento Tópico e Combinação de Drogas para a Leishmaniose Cutânea	29
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Parte 1 - Avaliação da Sensibilidade <i>in vivo</i> ao Antimoniato de Meglumina de Isolados de <i>Leishmania</i> spp.....	35
3.1.1 Parasitos.....	35
3.1.2 Fármaco	36
3.1.3 Cultivo dos Isolados e Infecção dos Animais.....	36
3.1.4 Tratamento dos Animais Infectados	37
3.2 Parte 2 - Avaliação da Atividade <i>in vivo</i> da combinação Sb ^V + Gel de PA em Isolados de <i>Leishmania</i> spp.....	38
3.2.1 Parasitos.....	38

3.2.2 Fármacos.....	38
3.2.3 Cultivo dos Isolados e Infecção dos Animais.....	38
3.2.4 Tratamento dos Animais Infectados.....	39
3.3 Avaliação da Eficácia do Tratamento.....	39
3.4 Análise Estatística	40
4 RESULTADOS	41
4.1 Avaliação da Sensibilidade <i>in vivo</i> ao Antimoniato de Meglumina de Isolados de <i>Leishmania</i> spp.....	41
4.2 - Avaliação da Atividade <i>in vivo</i> da combinação Sb ^V + Gel de PA em Isolados de <i>Leishmania</i> spp.....	61
5 DISCUSSÃO.....	72
6 CONCLUSÕES.....	81
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Curva dose-resposta para animais infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> M2903 e tratados com 20, 50, 100 e 200 mg Sb ^V /Kg/dia, IM, durante 20 dias	28
Figura 2 – Tamanho médio das lesões (mm) de hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> M2903 e tratados com antimonial pentavalente em diferentes concentrações e associado à aplicação tópica de paromomicina-gel	32
Figura 3 – Carga parasitária pós-tratamento verificada na lesão de hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> M2903 e tratados com antimonial pentavalente em diferentes concentrações e associado à aplicação tópica de paromomicina-gel.	33
Figura 4 – Carga parasitária pós-tratamento verificada no baço de hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> M2903 e tratados com antimonial pentavalente em diferentes concentrações e associado à aplicação tópica de paromomicina-gel.	33
Figura 5 – Lesão característica provocada pela infecção por <i>L. (V.) braziliensis</i> na base da cauda de hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) (A). Lesão cicatrizada pós-tratamento eficaz (B)	40
Figura 6 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> M2903	41
Figura 7 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> M2903	42
Figura 8 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC01.....	43
Figura 9 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC01	43
Figura 10 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC02.....	44
Figura 11 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC02.	44
Figura 12 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC03.....	45
Figura 13 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC03.	45
Figura 14 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC04.....	46

Figura 15 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC04.	46
Figura 16 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC05.	47
Figura 17 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC05.	47
Figura 18 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC09.	48
Figura 19 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC09.	48
Figura 20 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado 2824 CLIOC.	49
Figura 21 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado 2824 CLIOC.	49
Figura 22 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado 2889 CLIOC.	50
Figura 23 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado 2889 CLIOC.	50
Figura 24 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC08.	52
Figura 25 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC08.	52
Figura 26 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC06.	53
Figura 27 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC06.	53
Figura 28 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC07.	54
Figura 29 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC07.	54
Figura 30 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC10.	55
Figura 31 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC10.	55

Figura 32 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC11.....	56
Figura 33 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC11.	56
Figura 34 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com diferentes isolados de <i>Leishmania</i> spp. e com a cepa referência M2903. Todos animais receberam, por via, IM salina.	57
Figura 35 – Carga parasitária persistente nas lesões de hamsters infectados com diferentes isolados (LPC01 a LPC11, 2824 E 2889) de <i>Leishmania</i> spp. e com a cepa referência M2903 e não tratados (Grupos Controle).	58
Figura 36 – Carga parasitária persistente nos baços de hamsters infectados com diferentes isolados de (LPC01 a LPC11, 2824 E 2889) <i>Leishmania</i> spp. e com a cepa referência M2903 e não tratados (Grupos Controle).	58
Figura 37 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com diferentes isolados de <i>Leishmania</i> spp. e com a cepa referência M2903. Os animais foram tratados por via IM com 50mg Sb ^V /Kg/dia, por 20 dias.....	59
Figura 38 – Carga parasitária remanescente nas lesões de hamsters infectados com diferentes isolados (LPC01 a LPC11, 2824 e 2889) de <i>Leishmania</i> spp. e com a cepa referência M2903 e tratados com 50mg Sb ^V /Kg/dia, por 20 dias	60
Figura 39 – Carga parasitária remanescente nos baços de hamsters infectados com diferentes isolados (LPC01 a LPC11, 2824 e 2889) de <i>Leishmania</i> spp. e com a cepa referência M2903 e tratados com 50mg Sb ^V /Kg/dia, por 20 dias.	60
Figura 40 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com cepa referência M2903 e tratados com 25mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias.....	61
Figura 41 - Carga parasitária pós-tratamento nas lesões de hamsters infectados com a cepa M2903. Os animais foram tratados com 25mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias, por 20 dias.	62
Figura 42 - Carga parasitária pós-tratamento nos baços de hamsters infectados com a cepa M2903. Os animais foram tratados com 25mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias.	62
Figura 43 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC01 e tratados com 50mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias.....	63
Figura 44 - Carga parasitária pós-tratamento nas lesões de hamsters infectados com o isolado LPC01. Os animais foram tratados com 50mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias.....	64

Figura 45 - Carga parasitária pós-tratamento nos baços de hamsters infectados com o isolado LPC01. Os animais foram tratados com 50mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias.....	64
Figura 46 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC03 e tratados com 50mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias.....	65
Figura 47 - Carga parasitária pós-tratamento nas lesões de hamsters infectados com o isolado LPC03. Os animais foram tratados com 50mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias.....	66
Figura 48 - Carga parasitária pós-tratamento nos baços de hamsters infectados com o isolado LPC03. Os animais foram tratados com 50mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias.....	66
Figura 49 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC05 e tratados com 50mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias.....	67
Figura 50 - Carga parasitária pós-tratamento nas lesões de hamsters infectados com o isolado LPC05. Os animais foram tratados com 50mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias.....	68
Figura 51 - Carga parasitária pós-tratamento nos baços de hamsters infectados com o isolado LPC05. Os animais foram tratados com 50mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia, 25mg Sb ^V /Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias.....	68
Figura 52 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com diferentes isolados de <i>Leishmania</i> spp. e com a cepa referência M2903. Os animais foram tratados por via IM com 25mg Sb ^V /Kg/dia, por 20 dias.....	69
Figura 53 – Carga parasitária remanescente nas lesões (A) e baços (B) de hamsters infectados com diferentes isolados de <i>Leishmania</i> spp. e com a cepa referência M2903 e tratados com 25mg Sb ^V /Kg/dia, por 20 dias.....	69
Figura 54 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com diferentes isolados de <i>Leishmania</i> spp. e com a cepa referência M2903. Os animais foram tratados por via tópica com 100µL de gel de paromomicina, duas vezes ao dia, por 20 dias.	70
Figura 55 – Carga parasitária remanescente nas lesões (A) e baços (B) de hamsters infectados com diferentes isolados de <i>Leishmania</i> spp. e com a cepa referência M2903 e tratados por via tópica com 100µL de gel de paromomicina, duas vezes ao dia, por 20 dias.....	70
Figura 56 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com diferentes isolados de <i>Leishmania</i> spp. e com a cepa referência M2903. Os animais foram tratados com a associação 25mg Sb ^V /Kg/dia e 100µL de gel de paromomicina 10%, duas vezes ao dia, por 20 dias.	71

Figura 57 – Carga parasitária remanescente nas lesões (A) e baços (B) de hamsters infectados com diferentes isolados de *Leishmania* spp. e com a cepa referência M2903 e tratados com a associação 25mg SbV/Kg/dia e 100µL de gel de paromomicina 10%, duas vezes ao dia, por 20 dias..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de doenças tropicais por prioridade de pesquisa – OMS.....	19
Tabela 2 – Caracterização dos Isolados.....	36
Tabela 3 – Resumo da atividade da dose 50mg de Sb ^V sobre o tamanho de lesão e carga parasitária em hamsters infectados por isolados de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	80
Tabela 4 – Resumo comparativo entre a atividade da dose 25mg de Sb ^V isolada e em associação com paromomicina tópica, sobre o tamanho de lesão e carga parasitária em hamsters infectados por isolados de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> e pela cepa referência M2903.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Trifosfato
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
CI ₉₀	Concentração Inibitória de 90%
CLIOC	Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz
CPqRR	Centro de Pesquisa René Rachou
CRL	Centro de Referência em Leishmanioses
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IFN- γ	Interferon- γ
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-4	Interleucina-4
IM	Intramuscular
LCDF	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCDS	Leishmaniose Cutânea Disseminada
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LM	Leishmaniose Mucosa
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPC	Laboratório de Pesquisas Clínicas
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MBCL	Cloreto de Metilbenzetônio
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Paromomicina
Sb ^{III}	Antimonial Trivalente
Sb ^V	Antimonial Pentavalente

RESUMO

Apesar da busca por tratamentos alternativos para a Leishmaniose Cutânea (LC), os antimoniais pentavalentes (Sb^V) ainda permanecem como os fármacos mais amplamente usados no tratamento dessa doença. Eles podem ser eficazes e relativamente bem tolerados; entretanto, reações adversas graves e falha terapêutica ocorrem frequentemente. A possibilidade de a falha terapêutica estar associada a diferenças na sensibilidade ao Sb^V dos parasitos foi investigada utilizando-se, principalmente, análise de sensibilidade *in vitro*. Os resultados, até o momento, porém, são contraditórios. Portanto, faz-se necessária a busca por novos modelos de avaliação de sensibilidade a fármacos em *Leishmania* e por tratamentos alternativos que sejam menos tóxicos, como por exemplo, o desenvolvimento de formulações de uso tópico. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade *in vivo* de *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas de pacientes portadores de LC ao antimoniato de meglumina, bem como a atividade da combinação de uma baixa dose de Sb^V , considerando-se o modelo de hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), com aplicação tópica de uma formulação hidrofílica de paromomicina (PA). Para a análise de sensibilidade *in vivo*, hamsters foram infectados com 13 diferentes isolados e tratados com 50mg Sb^V /Kg/dia, durante 20 dias. Em comparação à resposta observada para a cepa de referência de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903, todos os isolados mostraram-se sensíveis ao antimoniato de meglumina. Para a avaliação da combinação Sb^V + PA, hamsters foram infectados com três dos 13 isolados utilizados na análise de sensibilidade e com a cepa M2903 e separados em grupos que receberam esquemas terapêuticos de 25mg Sb^V /Kg/dia, 25mg Sb^V /Kg/dia + PA e apenas PA, todos por 20 dias. Para esses isolados, a dose de 25mg Sb^V /Kg/dia, por 20 dias, por si só, foi eficaz na cicatrização dos animais, o que prejudicou a avaliação da eficácia da associação dessa dose com a aplicação tópica de PA, considerando o parâmetro tamanho de lesão. Porém, por outro lado, também evidenciou maior sensibilidade dos isolados ao antimoniato de meglumina. Considerando-se o parâmetro carga parasitária, a combinação dos fármacos foi eficiente para redução do parasitismo no sítio de lesão apenas em um dos isolados, quando comparada à ação dos fármacos isoladamente. Para a cepa M2903, a combinação Sb^V + PA mostrou-se eficaz na a redução do tamanho da lesão nos animais, mas não na redução da carga parasitária.

ABSTRACT

Despite the search for alternative treatments for cutaneous leishmaniasis (CL), the pentavalent antimonials (Sb^V) still remain the most widely used drugs in the treatment of this disease. They can be effective and well tolerated, but serious adverse reactions and therapeutic failure occur frequently. The relation between therapeutic failure and differences in sensitivity to Sb^V of parasites was investigated using *in vitro* sensitivity analysis mainly. The results until now, however, are inconclusive. Therefore, it is necessary to search for new models for evaluating drug susceptibility in *Leishmania* and for alternative treatments which are less toxic, such as the development of formulations for topical use. Therefore, the objective of this study was to evaluate the *in vivo* sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from patients with CL to meglumine antimoniate, as well as the activity of the combination of low doses of Sb^V , considering the model of gold hamsters (*Mesocricetus auratus*), with a topical paromomycin (PA) hydrophilic formulation. For *in vivo* sensitivity analysis, 13 hamsters were infected with different isolates and treated with 50mg Sb^V /kg/day for 20 days. In comparison to response observed for the reference strain of *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903, all isolates were susceptible to meglumine antimoniate. To evaluate the combination Sb^V + PA, hamsters were infected with three of the 13 isolates used in the sensitivity analysis and the strain M2903 and separated into groups that received 25 mg Sb^V /kg/day, 25 mg/kg/day + PA and only PA, all for 20 days. For these isolates, the dose of 25 mg Sb^V /kg/day for 20 days, by itself, was effective for the lesion healing, which hampered the evaluation of the efficacy of this dose associated with the topical application of PA, considering the lesion size parameter. However, on the other hand, this result also showed increased sensitivity of the isolates to meglumine antimoniate. Considering the parasitic load parameter, the combination of the drugs was effective in reducing the parasitism at lesion site in only one of the isolates compared to the action of the drugs alone. For M2903 strain, the PA + Sb^V combination was effective in reducing lesion size but not in the reducing the local parasitic burden.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana – Aspectos Gerais

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas que apresentam diferentes manifestações clínico-epidemiológicas e ampla distribuição mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de indivíduos estejam expostos ao risco de infecção, com prevalência global de 12 milhões de infectados e incidência de 1,5 a 2 milhões de casos a cada ano (WHO, 2012). Estima-se também que os indivíduos sob risco de adquirir leishmanioses recebam menos de US\$1,00 dólar por dia para o seu sustento, conforme relatado em estudos conduzidos na Índia (Thakur, 2000), Nepal (Adhikari *et al.*, 2003) e Brasil (Santos *et al.*, 2000). Assim, considerando-se o número de pessoas afetadas, principalmente populações de baixa renda, e o elevado custo do seu diagnóstico e tratamento, elas constituem um grave problema para o sistema de saúde em países da África, América Latina, Ásia e Europa. Embora o panorama seja preocupante, as leishmanioses ainda ocupam posição de destaque no ranking das doenças negligenciadas, sendo categorizadas pela Organização Mundial da Saúde como doenças emergentes que apresentam medidas de controle ainda inadequadas (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação de doenças tropicais por prioridade de pesquisa – OMS

Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3
Doenças com estratégias de controle insuficientes e em expansão.	Doenças com estratégias de controle existentes, mas que ainda não levaram à redução do impacto mundial.	Doenças com estratégias de controle efetivas e em situação de eliminação.
Dengue Leishmanioses Tripanossomíase Africana	Esquistossomose Malária Tuberculose	Doença de Chagas Filariose Lepra Oncocercose

Fonte – REMME *et al.*, 2002

Protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada de insetos vetores dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, são os responsáveis pelas variadas manifestações clínicas das leishmanioses. Eles são parasitos intracelulares obrigatórios

das células do sistema fagocítico mononuclear, que apresentam uma forma flagelada (promastigota), encontrada no tudo digestivo dos flebotomíneos, e outra aflagelada (amastigota), presente nos tecidos dos hospedeiros. A forma clínica está intrinsecamente relacionada com a espécie de *Leishmania* envolvida e a resposta do hospedeiro. A expressão clínica se caracteriza por amplo conjunto de acometimentos, principalmente agrupados na forma causada por espécies viscerotrópicas, a leishmaniose visceral (LV) – doença que acomete os órgãos do sistema mononuclear-fagocitário – e na forma causada por espécies dermatrópicas, a leishmaniose tegumentar (LT), caracterizada por lesões cutâneas ou mucosas.

Atualmente, do total de casos de LT, 90% ocorrem em apenas 10 países, sendo os principais: Irã, Arábia Saudita, Síria e Afeganistão, no Velho Mundo; Brasil e Peru, no Novo Mundo (WHO, 2012). No continente americano são reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e há uma grande diversidade na casuística dos diferentes países. No Brasil, a incidência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) vem aumentando consideravelmente, sendo *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* as três principais espécies responsáveis pela transmissão da doença, no país (Brasil, 2007).

O estudo da clínica, histopatologia e dos aspectos imunológicos, permitiram a classificação da LTA em cinco formas clínicas. A forma mais comum é a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), que pode ser causada pelas espécies dermatrópicas de *Leishmania*. É caracterizada pela presença de uma ou poucas lesões ulcerosas, indolores, com bordas altas, bem delimitadas e fundo granuloso, ocorrendo na maioria das vezes nas regiões descobertas do corpo. Apesar de essa forma apresentar uma tendência significativa à cura espontânea no Velho Mundo, o mesmo não é observado nas infecções do Novo Mundo (Mitropoulos *et al.*, 2010). A Leishmaniose Mucosa (LM) é causada principalmente pela *L. (V.) braziliensis*, acometendo as mucosas do nariz, boca, laringe e faringe, causando lesões graves e destrutivas. As lesões surgem meses ou anos após a cura clínica de lesões cutâneas primárias. A LM representa uma forma grave da infecção por *Leishmania*, requer maior tempo de tratamento e está associada ao maior número de falhas terapêuticas primárias e recidivas (Marsden *et al.*, 1986; Brasil, 2007). Por outro lado, A Leishmaniose Muco-Cutânea (LMC) apresenta lesões mucosas e presença concomitante de lesões cutâneas ativas, que em geral respondem bem ao tratamento habitual. As formas menos comuns são a cutânea difusa e

a cutânea disseminada. A Leishmaniose Cutânea Difusa (LCDF) é causada, no Brasil, principalmente pela *L. (L.) amazonensis*. É caracterizada pela presença de lesões nodulares não ulceradas, que podem distribuir-se por todo o corpo, e representa uma resposta anérgica à infecção (Bailey *et al.*, 2007). No Brasil, o número de casos relatados é muito pequeno e restrito, principalmente, nas regiões Norte e Nordeste. Já a Leishmaniose Cutânea Disseminada (LCDS) é uma entidade clínica pouco freqüente, observada em até 2% dos casos, caracterizada pela presença de múltiplas lesões pleomórficas, geralmente acneiformes, acometendo dois ou mais segmentos corporais não contíguos. Nesta forma clínica é comum o envolvimento das mucosas e a resposta ao tratamento é mais lenta, com dependência de maior dose e tempo de medicação. Indivíduos concomitantemente infectados pelo vírus HIV podem apresentar lesões disseminadas e o diagnóstico da LCDS sugere estado de imunodeficiência (Brasil, 2007).

Considerando os aspectos da resposta imune na LCL, estudos permitiram a elaboração de um paradigma em que a recuperação e resistência à doença devem-se principalmente ao componente celular da resposta imunológica. Os dados sugerem que a resposta imune celular efetiva é aquela que promove a síntese de IL-12 e a diferenciação de células T CD4+ do tipo 1, com produção de IFN- γ , ativação de macrófagos, produção de NO, eliminação dos parasitos e resolução da infecção. Por outro lado, a produção de IL-10 e TGF- β facilitariam a proliferação dos parasitos. Na LCDF, a resposta é predominantemente do tipo 2, com elevados níveis de IL-4, IL-10 e baixos níveis de IFN- γ , enquanto a LM apresenta resposta exacerbada do tipo 1 associada à destruição tecidual crônica e grave, em razão de forte resposta inflamatória e baixo nível de IL-10 capaz de modulá-la (Bailey *et al.*, 2007; Schriefer *et al.*, 2008). Convém ressaltar que o estudo dos aspectos imunopatológicos no curso da LTA é de suma importância, uma vez que abre perspectivas para novos métodos diagnósticos e alvos para quimioterapia.

1.2 Terapêutica da Leishmaniose Tegumentar Americana

O tratamento ideal para as leishmanioses seria um medicamento por via oral, 100% eficaz, em dose única, não sujeito ao desenvolvimento de resistência, de baixa toxicidade, baixo custo e que pudesse ser utilizado em populações vulneráveis. Nenhum dos medicamentos até agora utilizados para todas as formas da doença cumprem todos

esses critérios. Pelo desinteresse do mercado farmacêutico, são poucos os fármacos desenvolvidos, sendo o arsenal terapêutico realmente disponível para o controle da doença muito limitado.

Para todas as formas clínicas de leishmaniose, os antimoniais pentavalentes (Sb^{V}) são os fármacos mais amplamente usados no tratamento, que está baseado, principalmente, na quimioterapia. Atualmente, no Brasil, para o tratamento da LTA, o fármaco de primeira escolha é o antimonial pentavalente, na forma de antimoniato de meglumina (Glucantime[®]), em um esquema terapêutico recomendado pelo Ministério da Saúde, que consiste na administração dose parenteral de 10 a 20mg/kg/dia por 20 a 30 dias (Brasil, 2007). A droga é rapidamente absorvida e mais que 80% da dose administrada é excretada dentro de 24h após aplicação, por via renal, na forma inalterada. A eliminação ocorre em duas fases. Na primeira, a meia-vida é pequena e aproximadamente de duas horas, e na segunda fase, a meia-vida é mais lenta, cerca de 76h. Devido à rápida eliminação, altas doses de antimônio pentavalente em regime contínuo garantem sua quantidade adequada nos sítios de ação (Glucantime[®], 2009).

Apesar de serem empregados há mais de 90 anos no tratamento das leishmanioses, o mecanismo de ação desses fármacos não está completamente elucidado. Acredita-se que os antimoniais pentavalentes são pró-drogas que requerem redução biológica para a forma trivalente (Sb^{III}) para apresentarem atividade anti-*Leishmania*. Porém, o sítio (parasito, macrófago ou ambos) e o mecanismo de redução (enzimático ou não-enzimático) ainda permanecem não definidos. O Sb^{III} parece interferir em enzimas-chave do metabolismo energético das formas amastigotas de *Leishmania*, levando à depleção de ATP intracelular (Berman *et al.*, 1985; Berman *et al.*, 1987). Outros estudos têm sugerido a apoptose de amastigotas tratadas com Sb^{III} , envolvendo fragmentação do DNA e externalização de fosfatidilserina, como mecanismo de ação (Serenio *et al.*, 2001; Sudhandiran *et al.*, 2003).

Os antimoniais pentavalentes podem ser bastante eficazes e serem bem tolerados. Porém, frequentemente, produzem reações adversas que vão desde dor no local da injeção, febre, mialgias e artralgias, até efeitos colaterais potencialmente graves, como toxicidade hepatocelular, arritmias e pancreatites. Dentre todos os efeitos colaterais, o mais grave é aquele que incide sobre o aparelho cardiovascular. Este efeito é diretamente relacionado com idade do paciente, com a dose e com o tempo de tratamento, devendo ser acompanhado periodicamente por eletrocardiograma. Por essas razões, o uso dos antimoniais é contra-indicado em pacientes com algumas doenças

crônicas, grávidas e indivíduos acima de 60 anos. Para esses, e em casos em que não há resposta satisfatória ao antimonial pentavalente, o fármaco de escolha para o tratamento da LTA é a anfotericina B, um antibiótico poliênico produzido por diferentes espécies de *Streptomyces*. Esse fármaco também está longe de ser ideal, pois requer internação hospitalar e também pode causar reações adversas graves. Na tentativa de minimizar seus efeitos colaterais, foram desenvolvidas formulações lipídicas que apresentam elevada eficácia e menor toxicidade. No entanto, essas novas formulações são de alto custo, o que inicialmente, inviabilizou sua ampla utilização pelo sistema público de saúde. Esse cenário foi mudado por iniciativa de negociação da OMS, com expressiva redução no preço desse medicamento para os países em desenvolvimento, proporcionando maior acesso pelas populações que mais precisam.

Mesmo diante desse avanço, ainda permanecem as limitações de custo e adesão ao tratamento. O custo do tratamento por paciente com leishmaniose (medicação, internação e monitoração) é de cerca de US\$ 200, sendo o antimoniato de meglumina responsável por 40% deste custo (WHO, 2010). Além disso, as dificuldades relacionadas à aplicação de injetáveis e o acesso restrito aos serviços de saúde pelos seguimentos populacionais de baixo nível sócio-econômico constituem as principais causas de não adesão ao tratamento.

Assim, o atual arsenal de fármacos disponíveis para o tratamento da LTA está longe de ser satisfatório.

1.3 A Problemática da Resistência nas Leishmanioses

Além dos graves efeitos colaterais associados ao uso dos antimoniais pentavalentes, um outro problema surge diante do expressivo aumento da quantidade relatada de falhas terapêuticas. Apesar de a resposta terapêutica aos antimoniais ser geralmente favorável, há relatos de fracasso terapêutico em algumas situações, especialmente em pacientes com leishmaniose visceral e leishmaniose mucosa, tornando-se grave problema nas áreas endêmicas da doença (Alvar *et al.*, 1997; Sundar, 2001). Esses dados sugerem que cepas de *Leishmania* resistentes ao Sb^V podem ser selecionadas pela pressão exercida em anos de uso dos antimoniais.

Em distritos hiperendêmicos no norte do estado de Bihar, na Índia, 50-65% dos pacientes com LV não respondem ao tratamento com o antimonial pentavalente, sendo necessária sua extensão ou utilização de outras drogas, como anfotericina B,

aminosidina ou miltefosina. Algumas razões que explicam essa falha ao tratamento com Sb^V são o uso excessivo de doses sub-terapêuticas, duração incompleta do tratamento e medicamentos que não apresentam a devida qualidade (Sundar, 2001). Além disso, a falha terapêutica aos antimoniais pode ser atribuída a outros fatores, como a resposta imune inadequada do hospedeiro, problemas concernentes à farmacocinética das drogas e aspectos intrínsecos aos parasitos, como diferenças na sensibilidade ao Sb^V (Croft *et al.*, 2006).

A possibilidade de a falha terapêutica em indianos de Bihar estar associada à infecção por cepas resistentes ao Sb^V foi investigada no estudo de Lira *et al.*, 1999. Para isolados de aspirado de baço, caracterizados como *L. (L.) donovani*, houve forte correlação ($p < 0,001$) entre a resposta clínica e a sensibilidade *in vitro* ao antimônio pentavalente, avaliando a Concentração Inibitória (CI) de amastigotas intracelulares de isolados responsivos ao tratamento ($CI_{50} = 2,4 \pm 2,6$; $CI_{90} = 6,4 \pm 7,8 \mu g Sb^V/mL$) e de isolados não responsivos ($CI_{50} = 7,4 \pm 3,7$; $CI_{90} = 29,1 \pm 11,1 \mu g Sb^V/mL$). Não houve correlação quando os experimentos para avaliação da sensibilidade *in vitro* ao Sb^V foram conduzidos com promastigotas extracelulares. Abdo *et al.* (2003), utilizando 22 isolados de pacientes indianos, também caracterizados como *L. (L.) donovani*, e o modelo de amastigotas intracelulares, encontraram seis deles, provenientes de pacientes não responsivos, com resistência *in vitro* ao estibogluconato de sódio. Além disso, outros experimentos *in vitro* com amastigotas intracelulares têm mostrado resistência ao Sb^V de cepas de *L. (L.) donovani*, na Índia. De acordo com Sundar (2001), para isolados de pacientes resistentes ao tratamento, foram necessárias de 3 a 5 vezes maiores concentrações de Sb^V para inibir o crescimento de 50% dos parasitos, quando comparados aos isolados responsivos.

Por outro lado, estudos recentes conduzidos na mesma região asiática têm mostrado ausência de correlação entre a sensibilidade *in vitro* ao Sb^V e a resposta ao tratamento verificada *in vivo* (Rijal *et al.*, 2007).

Há também casos de LT do velho mundo com resistência primária ao antimônio fortemente associada ao isolamento de parasitos pouco sensíveis *in vitro*. Um estudo conduzido com 185 iranianos portadores de leishmaniose cutânea antroponótica mostrou que parasitos isolados das lesões dos pacientes com falha terapêutica ao Sb^V eram, no mínimo, quatro vezes menos sensíveis que os parasitos isolados daqueles que alcançaram cura terapêutica (Hadighi *et al.*, 2006).

Variações na resposta ao tratamento com antimonial pentavalente já estão descritas, também, na América Latina. Ao acompanhar 86 pacientes com leishmaniose cutânea, na Bolívia, observou-se 5,8% de falha terapêutica no tratamento com 20 mg Sb^V/Kg/dia, por 20 dias (Bermúdez *et al.*, 2006). Na Colômbia, um estudo que avaliou o tratamento de pacientes infectados por parasitos do subgênero *Viannia* com 20 mg Sb^V/Kg/dia, durante 20 dias, demonstrou falha em 33% (Palacios *et al.*, 2001). Já em um estudo realizado no Peru, 24,4% do total de pacientes portadores de LC e tratados com 20 mg Sb^V/Kg/dia, por 20 dias, não responderam ao tratamento. A falha terapêutica foi de 7,4% para os pacientes infectados com *L. (V.) guyanensis*, 28,6% para os infectados com *L. (V.) peruviana* e 31,0% para os infectados com *L. (V.) braziliensis* (Llanos-Cuentas *et al.*, 2008).

Mattos (2004), no Rio de Janeiro, avaliou pacientes tratados com antimonial pentavalente em diferentes esquemas terapêuticos (5mg Sb^V/Kg/dia, 10 a 20mg Sb^V/Kg/dia ou tratamento intralesional) . O índice de cura registrado, incluindo todos os pacientes, foi de 59,6%. O re-tratamento foi fator significativo, contribuindo para a cura de mais 41%, demonstrando que alguns pacientes necessitam de mais de um curso de tratamento para obter a cura, independente da dose. Em estudo conduzido por Romero *et al.* (2001), em pacientes de Corte de Pedras, Bahia, demonstrou-se diferença de resposta ao tratamento com antimoniato de meglumina entre *L. (V.) braziliensis* (n=61), com proporção de cura de 50,8%, e *L. (V.) guyanensis* (n=57), com proporção de cura de 26,3%, evidenciando um elevado risco para falha ao tratamento. Em uma recente meta-análise de tratamento da LC do Novo Mundo, com 12 estudos incluídos, totalizando 1150 pacientes, a taxa de cura encontrada com os antimoniais pentavalentes foi de 76,5%. Dentre os estudos provenientes do Brasil, a análise que agrupou 310 pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* apresentou taxa de cura média de 71,3%, variando de 40% a 100% (Tuon *et al.*, 2008).

No entanto, as análises do perfil de sensibilidade *in vitro* ao antimonial pentavalente de *Leishmania* spp. isoladas de pacientes com LTA, no Novo Mundo, são escassas e inconclusivas (Rojas *et al.*, 2006). Berman *et al.* (1982), utilizando promastigotas obtidas de lesões cutâneas de pacientes do Panamá e concentrações de 15 a 20 µg de Sb^V/mL, comparáveis às encontradas no soro humano, observaram que quatro cepas foram eliminadas em mais de 90% e duas outras eliminadas entre 70-75%. Na Colômbia, a sensibilidade *in vitro* ao Glucantime[®] de leishmânias do subgênero *Viannia* isoladas de pacientes com LC foi determinada, utilizando-se o modelo de

amastigotas intracelulares. Os valores de CI_{50} variaram de 5,3 a 170,0 μg de $\text{Sb}^{\text{V}}/\text{ml}$, contudo nenhuma correlação foi observada entre a quantidade total de Sb^{V} necessária para cura das lesões e a resposta *in vitro* ao medicamento (Robledo *et al.*, 1999). Por outro lado, utilizando o modelo *in vitro* de promastigotas extracelulares, Yardley et al. (2006) descreveram a ocorrência de resistência ao Sb^{V} em *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.

No Brasil, alguns estudos avaliaram a correlação entre a resposta clínica ao antimônio e a sensibilidade *in vitro* dos isolados de lesões da LTA, com resultados contraditórios. Azeredo-Coutinho et al. (2007), no Rio de Janeiro, demonstraram que isolados de *L. braziliensis* de pacientes com fraca resposta clínica ao Glucantime[®] têm valor de CI_{50} significativamente maior que isolados de pacientes cujas lesões foram curadas pelo medicamento, utilizando modelo de promastigotas extracelulares (n=19, $p<0,01$) quanto o de amastigotas intracelulares (n=10, $p<0,05$). Os autores sugerem que a alta sensibilidade de *L. braziliensis* circulantes naquela região ao antimoniato de meglumina provê uma explicação para a boa resposta clínica ao fármaco quando baixas doses são empregadas no tratamento. Já um estudo conduzido para avaliar a sensibilidade *in vitro* de isolados de 13 pacientes portadores de LTA, oriundos de quatro estados brasileiros (Goiás n=8, Tocantins n=2, Pará n=2 e Bahia n=1) e utilizando apenas o modelo de amastigotas intracelulares, não mostrou associação com o desfecho clínico do tratamento com o Glucantime[®] (Zauli-Nascimento *et al.*, 2010).

Em Belo Horizonte, avaliou-se a sensibilidade *in vitro* ao antimônio de 20 isolados de pacientes portadores de LC, atendidos no Centro de Referência em Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou – MG. A variação na sensibilidade *in vitro* entre os isolados chegou a ser superior a nove vezes, variando a CI_{50} de 116,46 a mais de 1000 μg $\text{Sb}^{\text{V}}/\text{mL}$ (Oliveria-Silva *et al.*, 2008).

1.4 A Adequação dos Modelos para Estudos de Resistência a Drogas

Questiona-se, a adequação dos ensaios atualmente utilizados para avaliar a sensibilidade *in vitro* como preditora da resposta terapêutica. Uma vez que estes ensaios têm sido conduzidos diretamente sobre formas promastigotas de *Leishmania* ou em modelo de amastigotas celulares, Rijal et al. (2007) sugeriram, como ajuste da técnica, a inclusão de algumas citocinas nesse modelo para mimetizar o efeito sinérgico do sistema imune. No entanto, até o momento, nenhum trabalho obteve sucesso na busca

de novas alternativas de estudo da sensibilidade aos antimoniais pentavalentes em isolados de pacientes. É possível que um estudo que buscasse avaliar a sensibilidade em modelo *in vivo* fosse mais fiel ao prognóstico da resposta terapêutica observada no paciente. Além disso, esse tipo de modelo possibilitaria o estudo dos mecanismos imunológicos estabelecidos diante da infecção por cepas sensíveis ou resistentes aos antimoniais.

O modelo murino reproduz muitos aspectos das leishmanioses cutâneas do velho e do novo mundo, sendo que o grau de susceptibilidade do modelo varia de acordo com a linhagem de camundongo e da espécie de *Leishmania* utilizada. A infecção subcutânea por *Leishmania major* em camundongos BALB/c é um dos modelos mais estudados (Sacks *et al.*, 2002; Gumy *et al.*, 2004). Essa linhagem é considerada a mais susceptível à infecção por *Leishmania*, mas ela não permite o desenvolvimento de lesões graves ou duradouras quando infectada com *L. (V.) braziliensis*. Esse fenótipo de resistência à infecção por esta espécie, em camundongos BALB/c, está relacionado, aparentemente, à produção de altos níveis de IFN- γ e à incapacidade do parasito provocar e sustentar uma forte produção de IL-4 (Dekrey *et al.*, 1998). Modelo experimental que permite infecção duradoura por *L. (V.) braziliensis* é obtido através do uso de hamsters dourados, *Mesocricetus auratus* (Wilson *et al.*, 1979; Gamboa *et al.*, 2007).

No Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou, a cepa referência de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903, isolada em 1975 de uma lesão cutânea de um homem que contraiu a infecção na floresta da Serra dos Carajás, Pará, Brasil (Balanco *et al.*, 1998) e considerada pela OMS uma cepa sensível ao antimônio pentavalente (Yardley *et al.*, 2006), é mantida em hamsters dourados através de repasses sucessivos realizados de 20 em 20 dias. Uma curva dose-resposta para o antimonio de meglumina foi realizada em 2010, em um grupo de hamsters experimentalmente infectados com essa cepa, nos quais foram analisados, semanalmente, os tamanhos das lesões, com auxílio de paquímetro digital como critério de eficácia do tratamento (Oliveira-Silva *et al.*, 2006). A figura 1 apresenta os resultados do estudo.

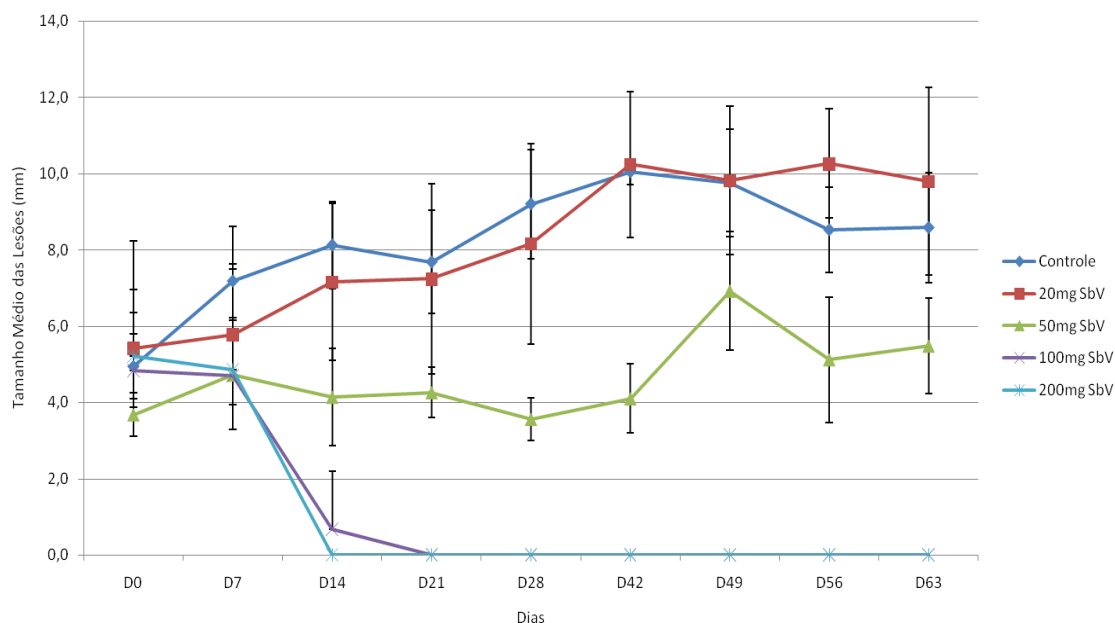


Figura 1 – Curva dose-resposta para animais infectados com *L. (V.) braziliensis* M2903 e tratados com 20, 50, 100 e 200 mg Sb^V/Kg/dia, IM, durante 20 dias. Os animais do grupo controle receberam salina. Oliveira-Silva, 2006.

Observa-se que a evolução no tamanho das lesões nos animais tratados com a dose de 20 mg Sb^V/Kg/dia foi semelhante àquela verificada nos animais que não receberam tratamento. A dose necessária para a cura dos animais infectados com a cepa M2903 esteve entre 100 e 200 mg Sb^V/Kg/dia. Essa dose demonstra a maior exigência desse modelo experimental no que se refere à quantidade de Sb^V necessária para eficácia do tratamento, uma vez que ela corresponde à uma dose cerca de 5 a 10 vezes superior àquela recomendada para uso em humanos. Além disso, observa-se que a dose de 50 mg Sb^V/Kg/dia foi eficiente para, durante o tratamento, manter o tamanho da lesão dos animais praticamente inalterado.

São poucos os estudos que avaliaram o comportamento de isolados de *Leishmania* spp provenientes de pacientes portadores de LTA, em modelos animais, principalmente relacionando esse comportamento com o tratamento com antimoniato de meglumina. Neste presente trabalho, avaliamos o comportamento de 13 isolados, obtidos de pacientes portadores de LC, em modelo de hamsters, e suas sensibilidades frente à dosagem de 50 mg Sb^V/Kg/dia, por 20 dias. A escolha dessa dosagem ocorreu tendo-se por base a metodologia utilizada nos estudos de sensibilidade *in vitro*. Nestes, a categorização de um isolado como resistente ou sensível se dá pelo cálculo do Índice de Atividade (IA). Esse parâmetro consiste na razão entre a CI₅₀ encontrada para o isolado e a CI₅₀ para a cepa de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903. Os

isolados que apresentam IA de 1-2 são considerados sensíveis ao Sb^V, enquanto aqueles com IA $\geq 5 - 6$ são considerados resistentes (Yardley *et al.*, 2006). Ao extrapolar essa metodologia para o ensaio *in vivo*, espera-se que hamsters infectados com isolados sensíveis e tratados com 50 mg/Kg/dia de antimônio apresentem evolução do tamanho da lesão semelhante à observada em hamsters infectados com a cepa M2903 e tratados com dose igual ou superior a 50 mg Sb^V/Kg/dia; enquanto os animais infectados com isolados resistentes teriam o comportamento semelhante ao observado com a dose igual ou inferior a 20 mg Sb^V, para hamsters infectados com a cepa referência.

Os dados gerados a partir dessa análise, além de contribuírem para o estudo mais apurado de sensibilidade ao antimonio de meglumina de *Leishmania* spp. circulantes em região endêmica para LTA, permitirão validar, ou não, o uso da cepa referência de *L. (V.) braziliensis* M2903 na quimioterapia experimental para LTA presente nessa região.

1.5 Tratamento Tópico e Combinação de Drogas para a Leishmaniose Cutânea

Frente às dificuldades encontradas no tratamento das leishmanioses, urge a pesquisa por novos fármacos e/ou a busca de novos tipos de tratamento para todas as formas da doença. Por isso, nas últimas décadas, muita ênfase tem sido dada ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas alternativas para as leishmanioses, incluindo a identificação de formulações para o tratamento tópico da LC (Arana *et al.*, 2001; Berman *et al.*, 2003). Esse tipo de tratamento pode ser interessante nos casos de doença não disseminada, oferecendo muitas vantagens em comparação ao tratamento convencional, como facilidade de administração do medicamento, menor incidência de efeitos adversos e redução dos custos associados ao tratamento, principalmente se consideramos que a LC ocorre, muitas vezes, em áreas onde o acesso aos cuidados em saúde é precário.

A paromomicina (PA) é o fármaco mais utilizado no tratamento tópico da LC. Ela é um antibiótico aminoglicosídeo extraído de culturas de *Streptomyces*, possui ação leishmanicida comprovada (El-On *et al.*, 1984; Neal *et al.*, 1995) e, atualmente, se encontra em fase de desenvolvimento avançado para o tratamento da leishmaniose visceral, na Índia (Sundar *et al.*, 2007). Porém, formulações tópicas de PA permanecem como um controverso tratamento de LC, uma vez que existem diferentes formulações,

que têm sido testadas contra diferentes espécies, em diferentes tipos de estudo, com muitos resultados inconclusivos ou conflitantes (Bailey *et al.*, 2007).

Pomada de PA a 15% associada a 12% de cloreto de metilbenzetônio (MBCL) apresentou resultados favoráveis, especialmente em infecções por *Leishmania (L.) major* (El-On *et al.*, 1987). Em um estudo conduzido na Guatemala, com pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana*, essa formulação apresentou taxa de cura de 91,4% (Arana *et al.*, 2001). Apesar disso, a eficácia desta formulação em infecções por espécies de *Leishmania* do Novo Mundo ainda não é suficientemente clara, já que, em modelos experimentais para *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) panamensis*, ela foi parcialmente efetiva (El-On *et al.*, 1987) e em estudo clínico com pacientes infectados por *L. (V.) panamensis* ela não se mostrou eficaz em comparação ao grupo tratado com antimoniato de meglumina (Soto *et al.*, 1998). Além disso, devido a reações locais como inflamação, sensação de queimação e dor no local após aplicação das formulações contendo MBCL observadas em ensaios *in vivo* e clínicos, seu uso clínico ficou limitado.

Foi testada, então, uma nova formulação tópica, com 15% de PA e 10% de uréia, visando facilitar a penetração da PA na lesão de pele. No entanto, a mesma controvérsia observada para a pomada PA/MBCL em relação à eficácia contra as espécies de *Leishmania* do Novo Mundo permanece. Apesar de ela ter sido eficaz em camundongos infectados com *L. (L.) major*, o mesmo não foi verificado para os animais infectados com *L. (L.) mexicana* e *L. (V.) panamensis* (Neal *et al.*, 1994). Em um estudo clínico conduzido na Tunísia e outro no Irã, ambos controlados e duplo-cegos, utilizando-se uma formulação hidrofóbica contendo PA 15% e uréia, não houve benefício clínico em relação ao grupo placebo (Ben-Salah *et al.*, 1995; Asilian *et al.*, 1995).

A partir de estudos que demonstraram maior penetração cutânea de paromomicina através de formulações hidrofílicas (géis ou cremes), Ferreira *et al.* (2002) desenvolveram uma formulação gel deste fármaco. A permeação cutânea *in vitro* da PA, avaliada em pele excisada de camundongos glabros na ausência do estrato córneo, foi muito maior, cerca de 30 vezes, a partir das formulações hidrofílicas em comparação com uma pomada de vaselina. A eficácia dessa formulação foi avaliada em modelos experimentalmente infectados com *L. (L.) major*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Nos estudos, o tratamento com o gel de PA promoveu redução significativa das lesões, apresentando atividade maior ou equivalente ao tratamento com antimoniato

de meglumina, dependendo da espécie (Gonçalves *et al.*, 2005; Mussi *et al.*, 2007). Estes dados subsidiam a adequação dessa nova formulação para estudos clínicos, podendo representar uma nova alternativa para o tratamento tópico da LC tanto no Velho quanto no Novo Mundo.

Dessa maneira, e considerando que um estudo de fase I em humanos voluntários sadios seria uma proposta inviável, uma vez que a aplicação tópica de PA pressupõe a falta de integridade da barreira cutânea para atuar, foi desenvolvido um estudo aberto, não controlado, para avaliar os efeitos terapêuticos e colaterais do gel de paromomicina em pacientes que apresentaram contra-indicações para o uso do antimônio pentavalente. Como a quantidade de PA absorvida através da pele é menor do que a aplicada por via parenteral nas doses convencionais do tratamento sistêmico, a aplicação tópica surgiu como alternativa terapêutica de menor toxicidade. Dos 14 pacientes incluídos, todos oriundos de uma área de transmissão de *L. (V.) braziliensis*, 8 (57,1%) apresentaram cura e 3 (14,3%) apresentaram melhora apenas com o uso da formulação hidrofílica de PA (Santos *et al.*, 2008). Estes resultados encorajam a realização de novos ensaios controlados em uma população de doentes menos selecionada que permita estimar a eficácia do medicamento.

Além dessa abordagem terapêutica, a combinação de drogas para as leishmanioses também tem se mostrado uma alternativa promissora por apresentar as seguintes vantagens: (i) aumentar a atividade anti-*Leishmania* através do uso de compostos com atividade sinérgica ou aditiva; (ii) evitar o surgimento da resistência aos fármacos, (iii) uso de doses menores, reduzindo as chances de efeitos colaterais tóxicos e reduzindo, também, custos (Croft *et al.*, 2006).

Essa alternativa já foi investigada para a associação entre a PA e o antimônio de meglumina em pacientes predominantemente infectados com *L. (V.) panamensis*. A eficácia da combinação da pomada de PA/MBCL com 20mg Sb^V/Kg/dia, durante 7 dias, foi de 90%. A redução do tempo de tratamento com antimônio buscava reduzir a incidência das reações adversas relacionadas ao fármaco. No entanto, 25% dos pacientes relataram reação adversa no local de aplicação da pomada, provavelmente devido à presença do MBCL (Soto *et al.*, 1995).

Com o objetivo de identificar associações sinérgicas entre fármacos com atividade anti-*Leishmania* sobre *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*, Morais-Teixeira (2009) avaliou, *in vitro*, a associação do sulfato de paromomicina com antimônio de meglumina, miltefosina, anfotericina B e azitromicina. Para *L. braziliensis*, a associação

PA + antimoniato de meglumina mostrou sinergismo. Em seguida, estudos *in vivo* foram conduzidos em hamsters experimentalmente infectados com a cepa MHOM/BR/1975/M2903 e tratados com diferentes doses de Glucantime e associações dessas doses com aplicação de 100 μ L de paromomicina-gel 2x ao dia, por 20 dias. Observa-se que a associação 50mg Sb^V/Kg/dia + paromomicina-gel foi eficaz para reduzir o tamanho da lesão dos animais e na redução da carga parasitária tanto no sítio da lesão quanto no baço, apresentando o mesmo perfil dos animais tratados com a dose de 200mg Sb^V/Kg/dia (Figuras 2, 3 e 4). Portanto, associado à paromocina, *in vivo*, é possível reduzir em até 4 vezes a dose de antimônio, obtendo a mesma eficácia de doses plenas desse fármaco. Esse resultado mostra o benefício de uma associação entre a PA e o Sb^V, uma vez que permite a redução de sua dose e, conseqüentemente, das reações adversas a ele relacionadas.

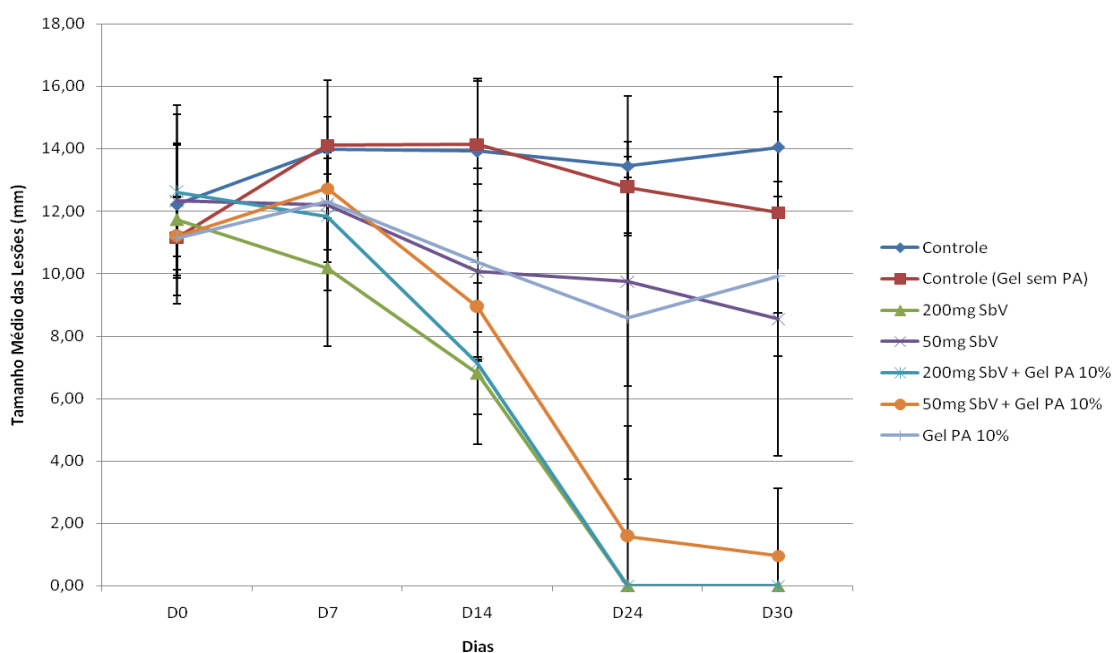


Figura 2 – Tamanho médio das lesões (mm) de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* M2903 e tratados com antimônio pentavalente em diferentes concentrações e associado à aplicação tópica de paromomicina-gel. Morais-Teixeira , 2010

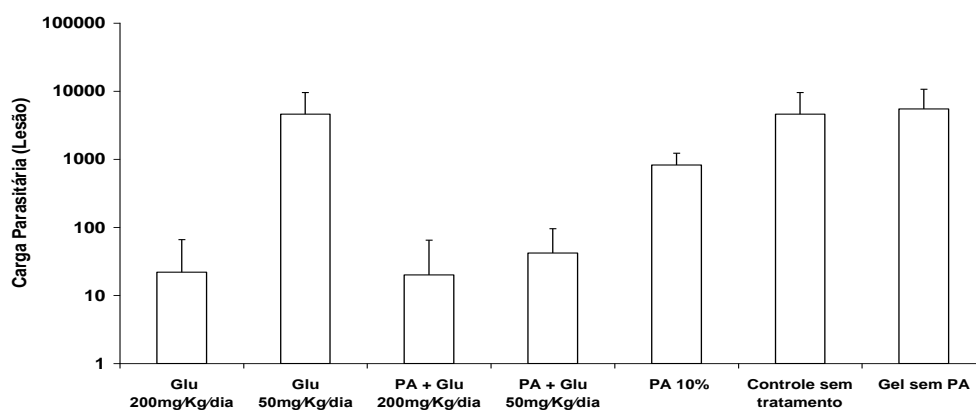


Figura 3 – Carga parasitária pós-tratamento verificada na lesão de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* M2903 e tratados com antimonial pentavalente em diferentes concentrações e associado à aplicação tópica de paromomicina-gel. Moraes-Teixeira , 2010

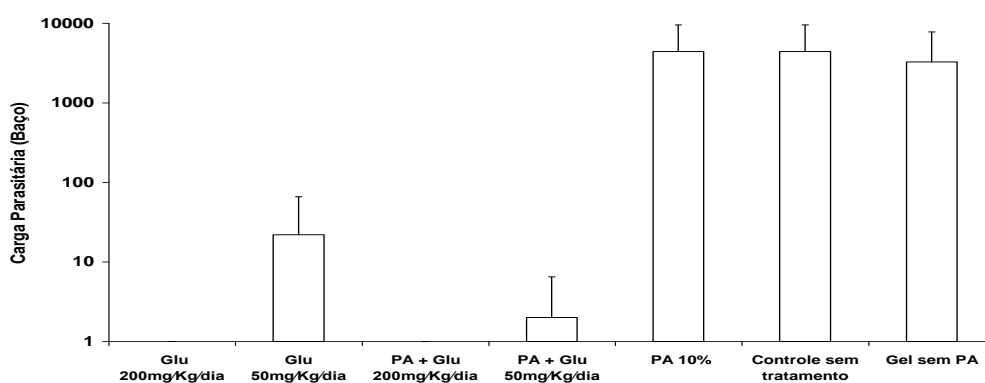


Figura 4 – Carga parasitária pós-tratamento verificada no baço de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* M2903 e tratados com antimonial pentavalente em diferentes concentrações e associado à aplicação tópica de paromomicina-gel. Moraes-Teixeira , 2010

Diante dos dados relatados nesse estudo e da grande sensibilidade *in vivo* ao antimoniato de meglumina observada nos isolados de *Leishmania* spp. circulantes na região de Minas Gerais (dados iniciais obtidos neste trabalho), avaliamos a atividade de uma dose baixa (considerando-se o modelo de hamsters) de Sb^V (25 mg/Kg/dia), associada à aplicação de 100 µL de paromocina-gel 10%, 2 vezes ao dia, por 20 dias, em hamsters experimentalmente infectados com *Leishmania* spp isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea e com a cepa M2903.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar, em modelo *in vivo*, a atividade do antimoniato de meglumina e de sua associação com a paromomicina-gel sobre *Leishmania* spp. isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar a evolução da leishmaniose cutânea em hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados por *Leishmania* spp. isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea.

Comparar a evolução da leishmaniose cutânea em hamsters causada pelos isolados com aquela causada pela infecção com a cepa referência de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903.

Comparar a atividade *in vivo* anti-*Leishmania* do antimoniato de meglumina entre os isolados e a cepa referência de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903.

Comparar a atividade *in vivo* anti-*Leishmania* da combinação antimoniato de meglumina e paramomicina-gel entre os isolados e a cepa referência de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903.

Avaliar, *in vivo*, a sensibilidade à paromomicina dos isolados estudados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Parte 1 - Avaliação da Sensibilidade *in vivo* ao Antimoniato de Meglumina de Isolados de *Leishmania* spp.

3.1.1 Parasitos

Onze de 13 isolados de *Leishmania* spp. utilizados nos ensaios *in vivo* foram obtidos a partir de aspirados de lesões cutâneas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, atendidos no ambulatório do Centro de Referência em Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou (CRL – CPqRR), conforme rotina de diagnóstico. Destes, nove foram enviados para caracterização no Serviço de Isolamento, Cultivo e Tipagem de *Leishmania* da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC). Dois isolados foram cedidos pela CLIOC, um isolado de paciente de Corte de Pedra – BA e outro oriundo do Rio de Janeiro – RJ, codificados como 2889 e 2824, respectivamente. Os isolados provenientes do CRL foram codificados de LPC01 a LPC11. Todos os isolados foram obtidos antes do início do tratamento dos pacientes. Além dos 13 isolados, utilizou-se, para fins de comparação, a cepa referência de *Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903 mantida em hamsters (*Mesocricetus auratus*), no Laboratório de Pesquisas Clínicas do CPqRR.

A caracterização dos isolados foi realizada através de eletroforese das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH), conforme descrito por Cupolillo et al. (1994), e o resultado encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização dos Isolados

Isolado	Local de Isolamento	Resultado da Caracterização	Código de Depósito (IOC-L)
LPC01	Belo Horizonte - MG	<i>L. (V.) braziliensis</i>	3364
LPC02	Belo Horizonte - MG	--- ¹	--- ¹
LPC03	Belo Horizonte - MG	<i>L. (V.) braziliensis</i>	3360
LPC04	Belo Horizonte - MG	<i>L. (V.) braziliensis</i>	3361
LPC05	Belo Horizonte - MG	<i>L. (V.) braziliensis</i>	3366
LPC06	Belo Horizonte - MG	<i>L. (V.) braziliensis</i>	3367
LPC07	Belo Horizonte - MG	<i>L. (V.) braziliensis</i>	3362
LPC08	Belo Horizonte - MG	--- ¹	--- ¹
LPC09	Belo Horizonte - MG	--- ¹	--- ¹
LPC10	Belo Horizonte - MG	<i>L. (V.) braziliensis</i>	3363
LPC11	Belo Horizonte - MG	<i>L. (V.) braziliensis</i>	3365
2824 CLIOC	Rio de Janeiro – RJ	<i>L. (V.) braziliensis</i>	2824
2889 CLIOC	Corte de Pedras - BA	<i>L. (V.) braziliensis</i>	2889

¹ Amostra não caracterizada e não depositada devido contaminação por fungos ou bactérias

3.1.2 Fármaco

Utilizou-se o antimoníato de meglumina (Glucantime[®], Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil). Cada ampola de 5 mL contém 405 mg de antimônio pentavalente (Sb^V), correspondendo a 81mg/mL.

3.1.3 Cultivo dos Isolados e Infecção dos Animais

Para a análise da sensibilidade *in vivo* ao antimoníato de meglumina, cada um dos 13 isolados foi cultivado em dois erlenmeyers de 125 mL, contendo 5 mL de meio NNN, 10 mL de meio Schneider pH 7,2, suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino, antibióticos penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 U/mL e 2% de urina humana masculina filtrada e mantidos em estufa BOD a 26°C, durante o período de crescimento dos parasitos. No 5º dia de crescimento, o meio de cultura dos dois frascos foi misturado em tubo falcon de 50 mL, centrifugado a 1000g, 26°C e 10 min, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensionado em 600 µL de PBS. Dessa suspensão de promastigotas foram injetados 300 µL em cada pata traseira de um hamster para cada isolado. Após o desenvolvimento de lesão cutânea, as mesmas foram retiradas, com auxílio de pinça e tesoura, maceradas em PBS e 300 µL do produto foram repassados para cada pata traseira de outros três hamsters. Novamente, após desenvolvimento das lesões, as mesmas foram retiradas, maceradas em PBS e quantificadas em câmara de

Newbauer. Oito hamsters, previamente tricotomizados, foram infectados com a suspensão de amastigotas na ordem de 10^6 parasitos através de injeção intradérmica na base da cauda. Com relação à cepa referência M2903, três hamsters foram primeiramente infectados com suspensão não quantificada de amastigotas nas patas traseiras e, em seguida, as lesões desses animais retiradas, maceradas, quantificadas e 10^6 parasitos, aproximadamente, foram injetados na base da cauda de oito hamsters. Todos os animais eram machos e pesavam, aproximadamente, 100g. Os animais utilizados neste estudo foram tratados de acordo com os regulamentos locais e federais e os protocolos de pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de Animais da Fiocruz (Protocolo P-321/06, Licença L-0024 /08).

3.1.4 Tratamento dos Animais Infectados

Para cada isolado e para a cepa M2903, após o desenvolvimento das lesões na base da cauda, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de quatro animais: *grupo tratado*, que recebeu a dose de 50 mg/Kg/dia de antimônio pentavalente (Sb^V), por via intramuscular, durante 20 dias, e *grupo controle*, que recebeu a mesma quantidade em volume de solução fisiológica, via IM, por 20 dias.

3.2 Parte 2 - Avaliação da Atividade *in vivo* da combinação Sb^V + Gel de PA em Isolados de *Leishmania* spp.

3.2.1 Parasitos

Para a avaliação do tratamento com antimoniato de meglumina IM associado ao gel de paromomicina por via tópica em hamsters infectados com isolados de *Leishmania* spp, foram utilizados 3 dos 13 isolados descritos, a saber: LPC01, LPC03 e LPC05. Também foi utilizada a cepa M2903, para fins de comparação.

3.2.2 Fármacos

Foram utilizados os fármacos antimoniato de meglumina (conforme item 5.2.1) e o sulfato de paromomicina (757 µg/mg, Antibioticos, Milão, Itália). A paromomicina (PA) foi aplicada por via tópica utilizando-se a formulação hidrofílica desenvolvida e preparada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG. O gel de PA foi preparado pelo aquecimento de 1,5% de hidroxietilcelulose (Natrosol 250 HR; Aqualon), 10% propilenoglicol (BASF, Ludwigshafen, Germany) e 0,2% de metilparabeno em água até 60–70 °C, sob agitação constante, até a obtenção de um gel transparente. Depois de esfriado, a PA, previamente dissolvida em água, foi incorporada ao gel na concentração de 10%. Em seguida, a mistura foi homogeneizada até uma preparação transparente ser alcançada.

3.2.3 Cultivo dos Isolados e Infecção dos Animais

Os isolados foram descongelados em temperatura ambiente, cultivados, centrifugados, re-suspendidos (conforme item 3.1.3) e injetados nas patas traseiras de 2 hamsters, para cada isolado. Após desenvolvimento das lesões, o procedimento de repasse (item 3.1.3) foi realizado para seis hamsters e, novamente, para 25 hamsters, dessa vez quantificado na ordem de 10⁶ amastigotas injetadas na base da cauda dos animais previamente tricotomizados. Com relação à cepa referência M2903, seis hamsters foram primeiramente infectados com suspensão não quantificada de amastigotas nas patas traseiras e, em seguida, as lesões desses animais foram retiradas, maceradas, quantificadas e 10⁶ parasitos, aproximadamente, foram injetados na base da

cauda de 15 hamsters. Todos os animais eram machos e pesavam, aproximadamente, 100g.

3.2.4 Tratamento dos Animais Infectados

Para cada isolado, após o desenvolvimento das lesões na base da cauda, os animais foram divididos em cinco grupos de cinco animais, de modo que a média do tamanho das lesões antes do tratamento, em cada grupo, fosse semelhante. Excetuando-se o grupo controle, que não recebeu nenhuma intervenção farmacológica, os grupos tratados foram divididos da seguinte forma: dose de 50 mg/Kg/dia de antimônio pentavalente (Sb^V) por via intramuscular, durante 20 dias; dose de 25 mg/Kg/dia de Sb^V IM, durante 20 dias; dose de 25 mg/Kg/dia de Sb^V IM associada com aplicação de 100 μ L da formulação hidrofílica de PA 10%, duas vezes ao dia, por 20 dias e grupo tratado apenas com aplicação de 100 μ L da formulação hidrofílica de PA 10%, duas vezes ao dia, por 20 dias. Para a cepa M2903, os animais foram divididos em grupo controle (n=3), grupo tratado com 25 mg/Kg/dia de Sb^V IM, por 20 dias (n=4), grupo tratado com a associação Sb^V IM e gel de PA, por 20 dias e grupo tratado apenas com gel de PA por 20 dias.

3.3 Avaliação da Eficácia do Tratamento

Antes, durante e após o tratamento, o tamanho das lesões foi determinado utilizando-se paquímetro. A aferição foi realizada nos tempos D0 – um dia antes do início do tratamento, D7 – 7 dias após o início do tratamento, D14 – 14 dias após o início do tratamento, D21 – um dia após o término do tratamento e D25 – 5 dias após o término do tratamento (dia da eutanásia dos animais). O tamanho considerado da lesão foi o maior diâmetro medido, em mm. A título de ilustração, a Figura 5 apresenta o aspecto de uma lesão característica pré-tratamento (A) e de uma lesão cicatrizada pós-tratamento (B).

Foi avaliada a carga parasitária pós-tratamento na lesão e no baço dos animais. Para tanto, cinco dias após o término do tratamento, os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 e as lesões e/ou peles íntegras foram cortadas e maceradas em meio Schneider pH 7,2 suplementado com 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina. Os tubos contendo o macerado de lesão ou pele foram centrifugados a

3000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante coletado em outro tubo para centrifugação a 1700 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet re-suspendido em 1 mL de meio Schneider pH 7,2 suplementado com 20% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina. Após homogeneização 300 µL foram transferidos, em triplicata para os primeiros poços de placas de 96 poços. Os demais foram preenchidos com 270 µL de meio. A diluição seriada foi feita transferindo 30 µL de um poço para outro, sucessivamente. A placa foi incubada a 26°C por 5 dias, quando foi feita a avaliação do experimento através da busca por parasitos viáveis até a maior diluição. Os baços foram cortados e macerados também na presença de meio Schneider suplementado com antibiótico. Os tubos contendo o macerado de baço foram centrifugados a 500 rpm por 2 minutos e o sobrenadante coletado em outro tubo para centrifugação a 3000 rpm por 2 minutos. Em seguida, o procedimento foi idêntico ao descrito para os macerados de lesão.

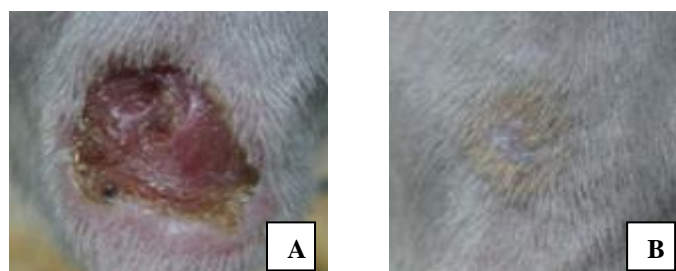


Figura 5 - Lesão característica provocada pela infecção por *L. (V.) braziliensis* na base da cauda de hamsters (*Mesocricetus auratus*) (A). Lesão cicatrizada pós-tratamento eficaz (B).

3.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA, 2003). A carga parasitária da lesão e do baço, bem como o tamanho da lesão dos animais, foi avaliada quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (KS). Se apresentando distribuição normal, os dados foram avaliados por análise de variância One Way ANOVA, seguido do teste de Tukey. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da Sensibilidade *in vivo* ao Antimoniato de Meglumina de Isolados de *Leishmania* spp.

O desenvolvimento de lesões na base da cauda dos hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* M2903 ocorreu segundo padrão observado em outros trabalhos do nosso grupo. O tamanho médio das úlceras foi de 4,39 mm para o grupo controle e 9,29 mm para o grupo tratado, quatro semanas após a inoculação dos parasitos nos animais, momento no qual se iniciou o tratamento. Pelo fato de essa diferença não ter sido corrigida, houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) no tamanho médio das lesões em D0 e D7. Apesar disso, observa-se que enquanto o grupo que recebeu salina (grupo controle) evoluiu com o aumento do tamanho médio das lesões, o grupo tratado com a dose de 50 mg de $Sb^V/Kg/dia$, por 20 dias, permaneceu com o diâmetro médio das lesões praticamente inalterado (Figura 6).

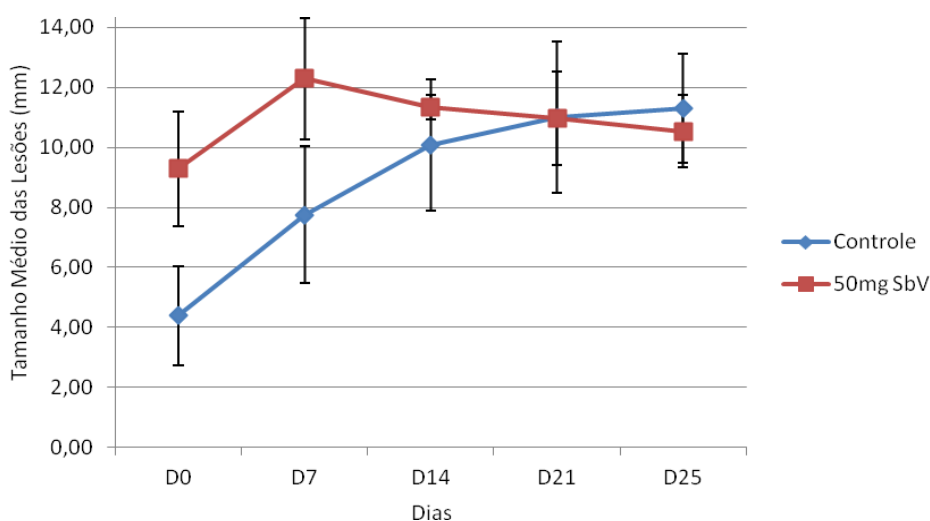


Figura 6 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* M2903. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg $Sb^V/Kg/dia$ ou salina (grupo controle), por 20 dias. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) em D0 e D7.

Com relação à carga parasitária nos tecidos, a Figura 7 mostra que a dose de 50mg/Kg/dia apenas é eficaz para reduzir a carga parasitária no baço ($p < 0,001$) e não na lesão ($p > 0,05$) dos animais infectados com a cepa M2903. Este comportamento já havia sido descrito por Moraes-Teixeira (2010).

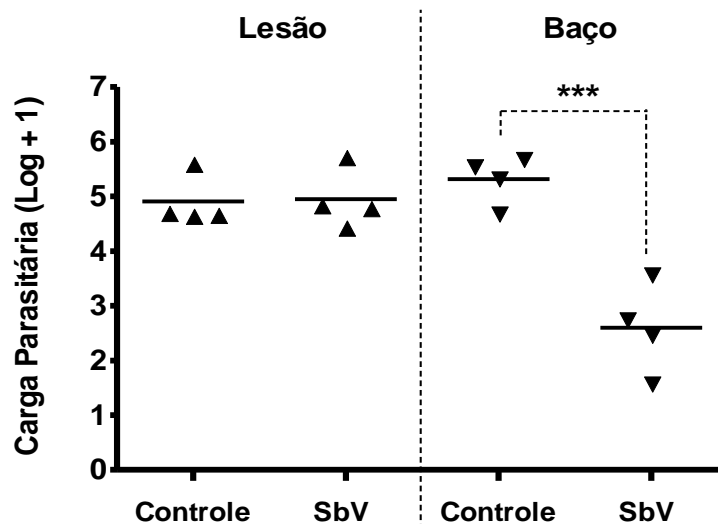


Figura 7 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* M2903. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de tecido. *** p < 0,001 comparado com o grupo controle.

O tempo de desenvolvimento das lesões na base da cauda de hamsters infectados com isolados de *Leishmania* spp. variou de uma a duas semanas após a inoculação dos parasitos. O tamanho médio das lesões, antes do início do tratamento, variou bastante entre os isolados, sendo 2,53 mm a menor média e 12,57 mm a maior. Observando a evolução do tamanho de lesão entre os grupos controle de todos os isolados, percebe-se que, dependendo do isolado, pode haver dois padrões na evolução da doença nos hamsters:

Padrão persistência: aquele que reflete a tendência da infecção pela cepa M2903, onde se vê claramente um aumento no tamanho da lesão e persistência da mesma em relação ao tempo.

Padrão regressão: aquele em que os animais apresentam tendência à cura espontânea ou diminuição significativa do tamanho de lesão ou até mesmo sua cicatrização completa em algum momento do experimento.

As figuras 8 a 22 apresentam a evolução no tamanho de lesão dos animais infectados com oito isolados que apresentaram o *padrão persistência* e a análise da carga parasitária pós-tratamento na lesão e no baço desses animais.

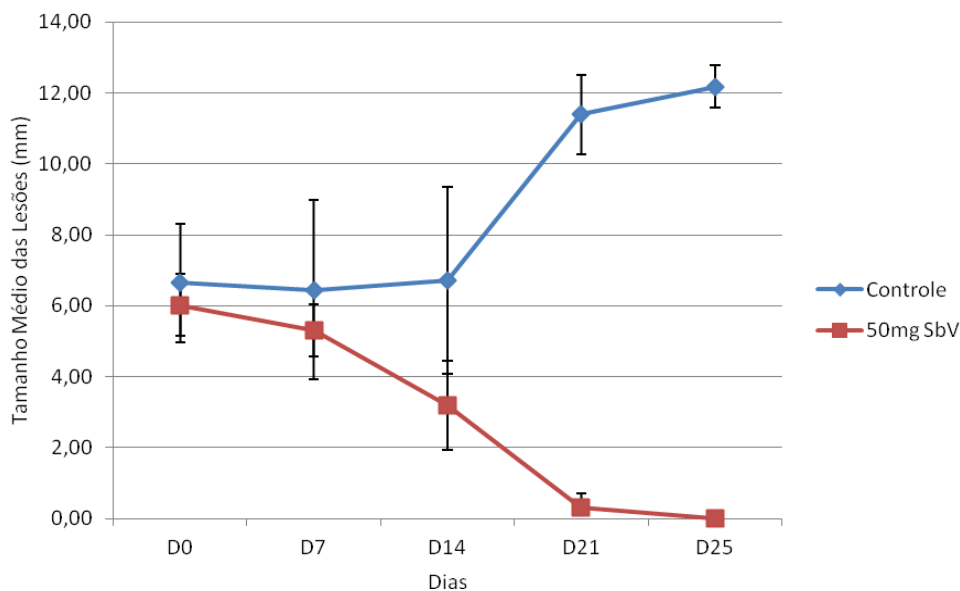


Figura 8 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC01. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. Houve diferença significativa entre o grupo controle e o tratado, p < 0,05, a partir de D14.

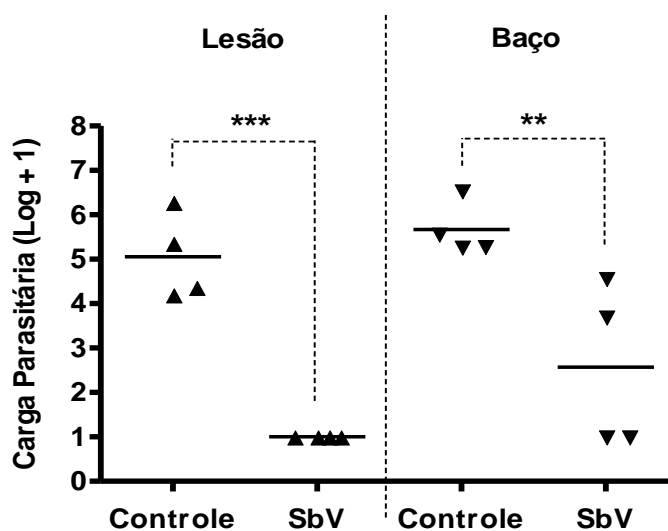


Figura 9 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC01. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de tecido. ** p < 0, 01 e *** p < 0,001 comparado com o grupo controle.

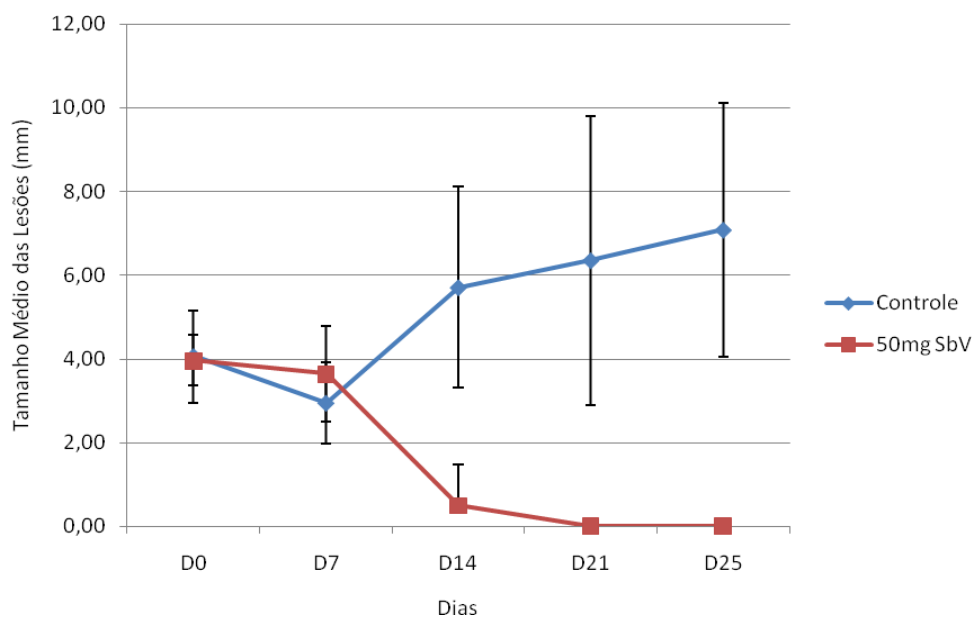


Figura 10 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC02. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. Houve diferença significativa entre o grupo controle e o tratado, $p < 0,05$, a partir de D14.

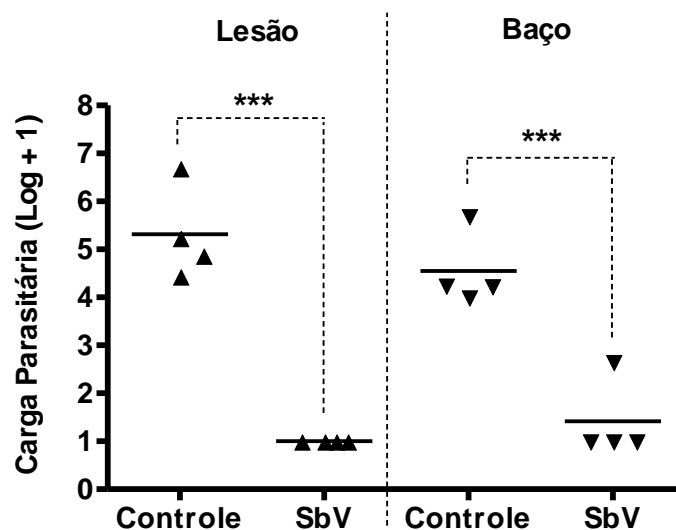


Figura 11 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC02. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou com salina (grupo controle), por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de tecido. ** $p < 0, 01$ e * $p < 0,001$ comparado com o grupo controle.**

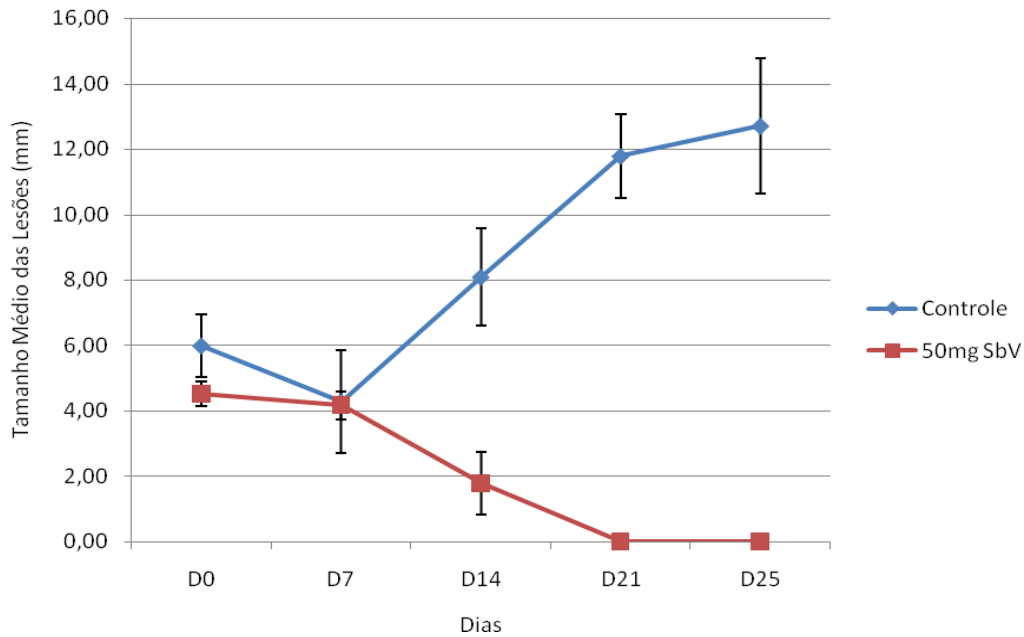


Figura 12 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC03. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. Houve diferença significativa entre o grupo controle e o tratado. p < 0,05, a partir de D14.

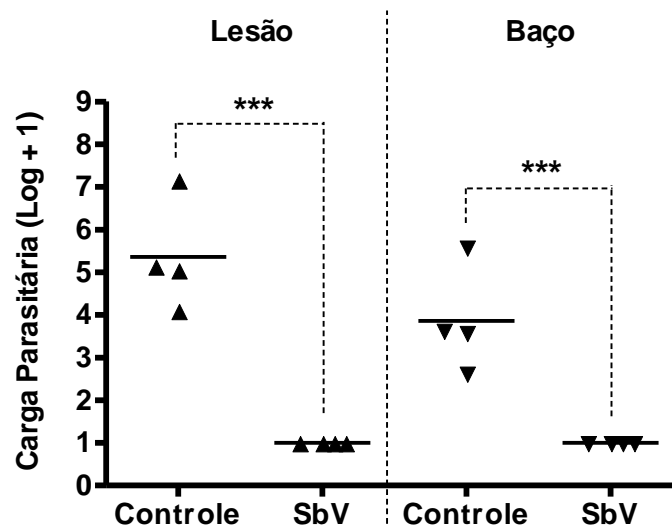


Figura 13 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC03. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de tecido. *** p < 0,001 comparado com o grupo controle.

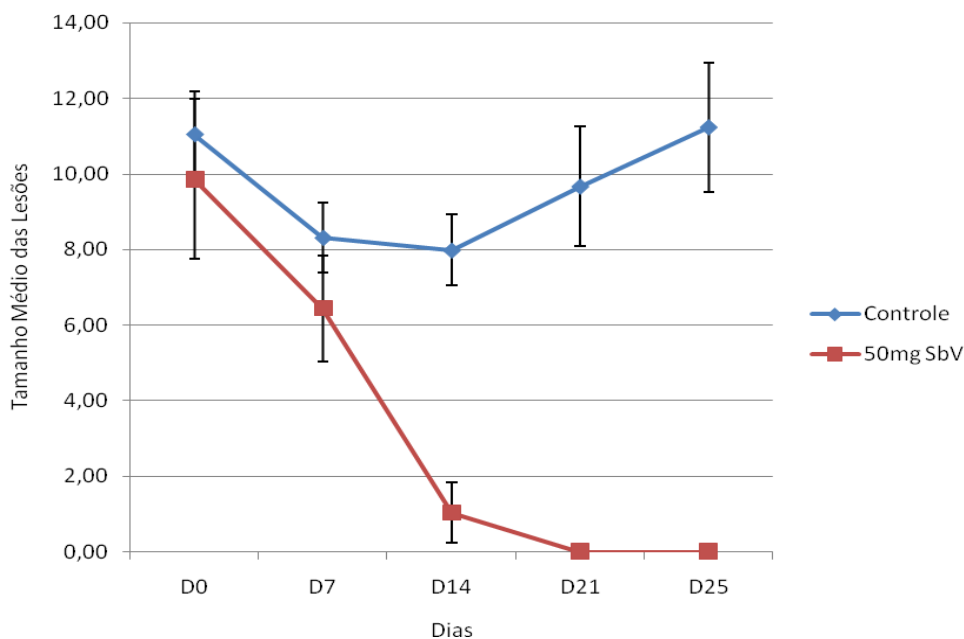


Figura 14 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC04. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. Houve diferença significativa entre o grupo controle e o tratado, p < 0,05, a partir de D14.

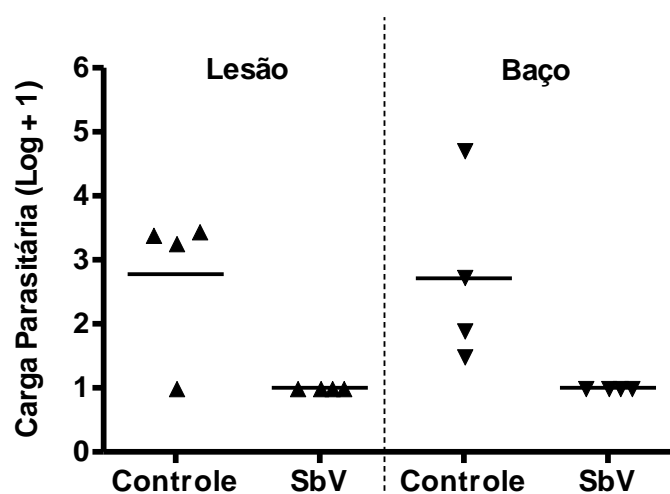


Figura 15 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC04. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de tecido. * p < 0, 05 e *** p < 0,001 comparado com o grupo controle.

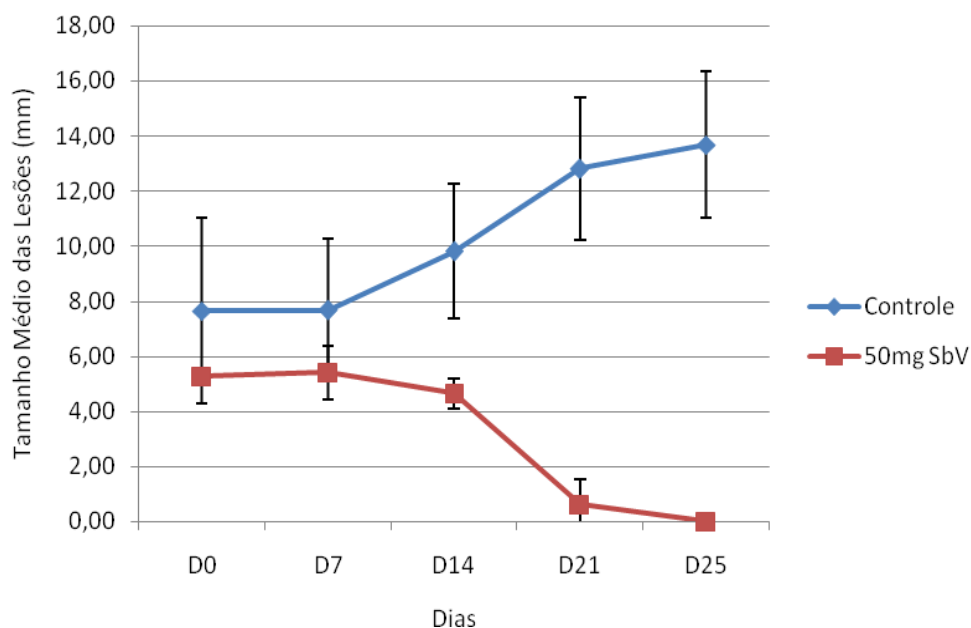


Figura 16 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC05. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. Houve diferença significativa entre o grupo controle e o tratado, p < 0,05, a partir de D14.

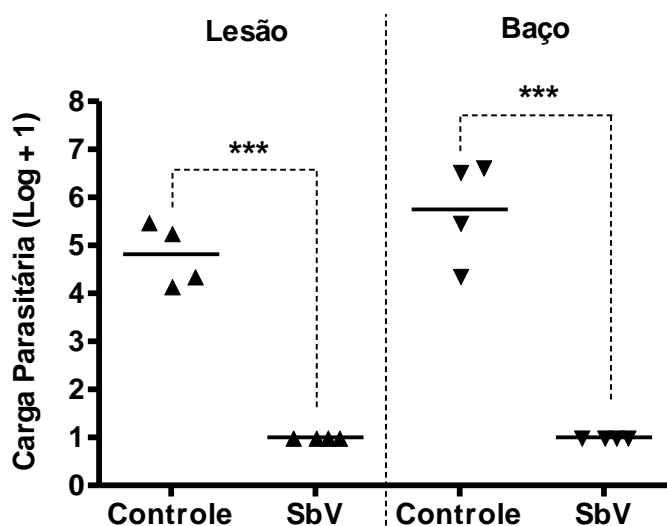


Figura 17 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC05. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de tecido. ** p < 0, 01 e *** p < 0,001 comparado com o grupo controle.

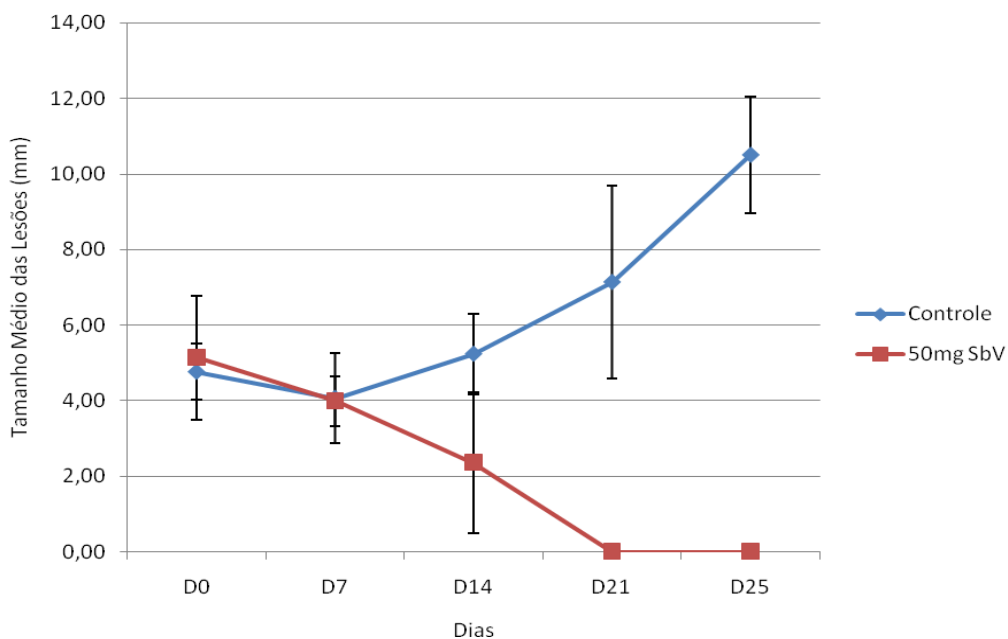


Figura 18 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC09. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. Houve diferença significativa entre o grupo controle e o tratado, p < 0,05, a partir de D21.

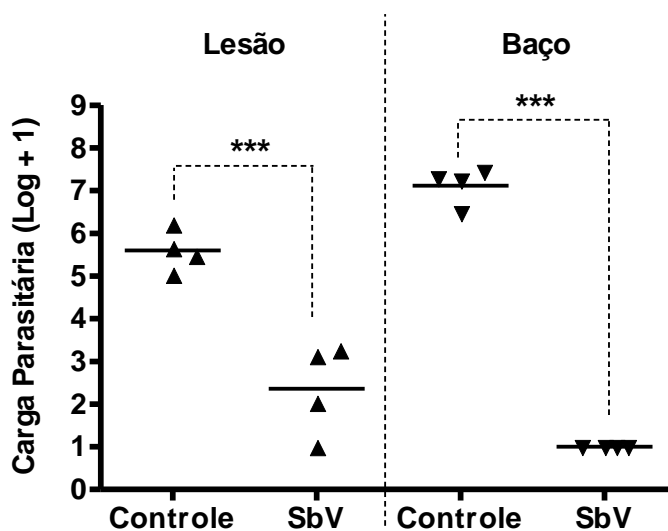


Figura 19 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC09. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de tecido. *** p < 0,001 comparado com o grupo controle.

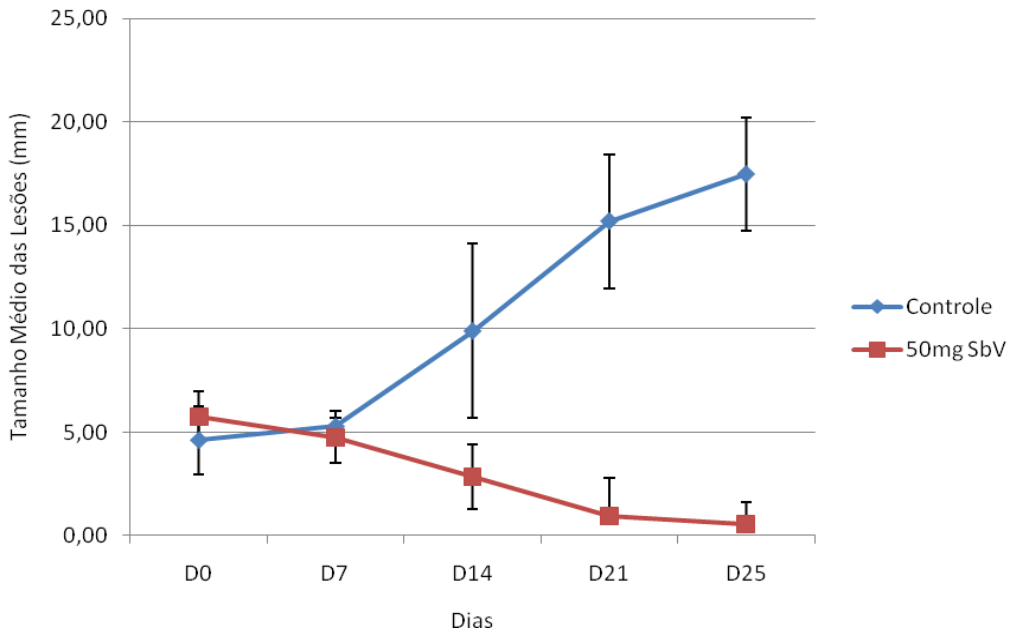


Figura 20 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado 2824 CLIOC. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. Houve diferença significativa entre o grupo controle e o tratado, p < 0,05, a partir de D14.

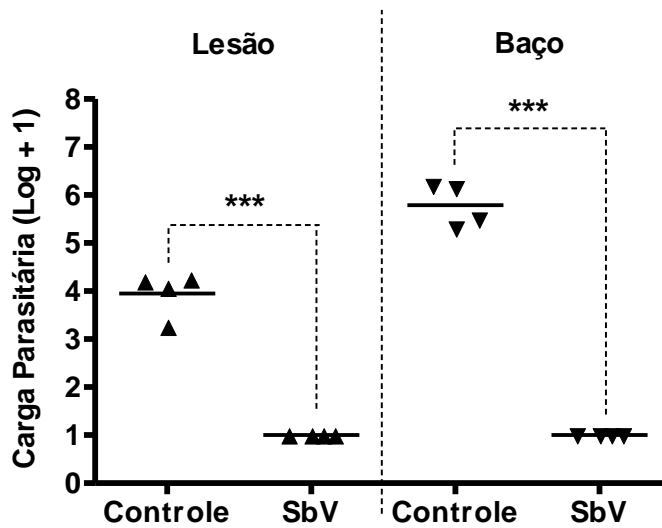


Figura 21 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado 2824 CLIOC. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de tecido. ** p < 0, 01 e *** p < 0,001 comparado com o grupo controle.

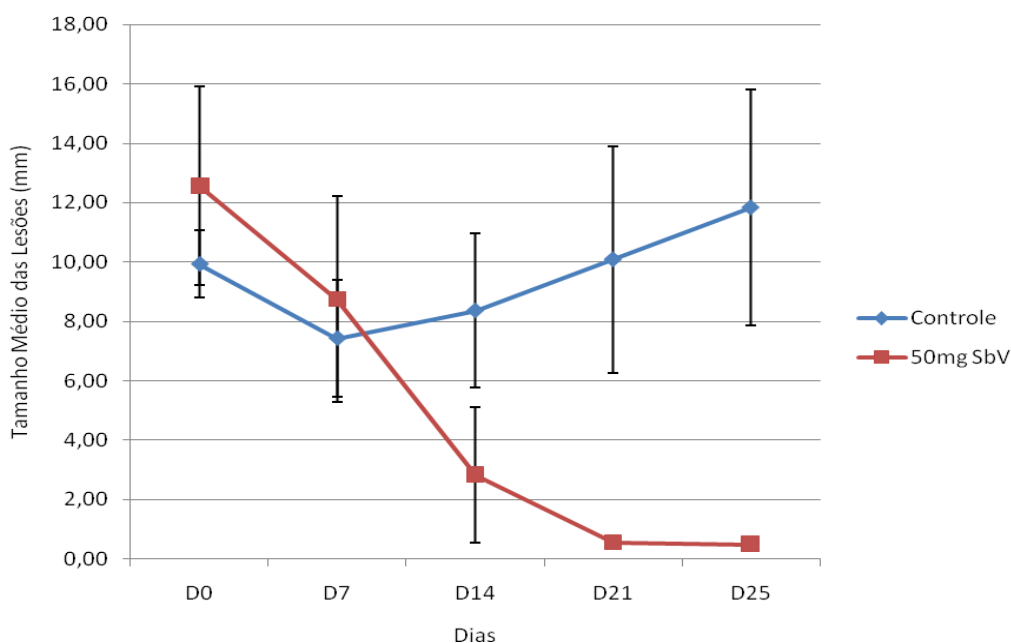


Figura 22 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado 2889 CLIOC. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. Houve diferença significativa entre o grupo controle e o tratado, $p < 0,05$, a partir de D21.

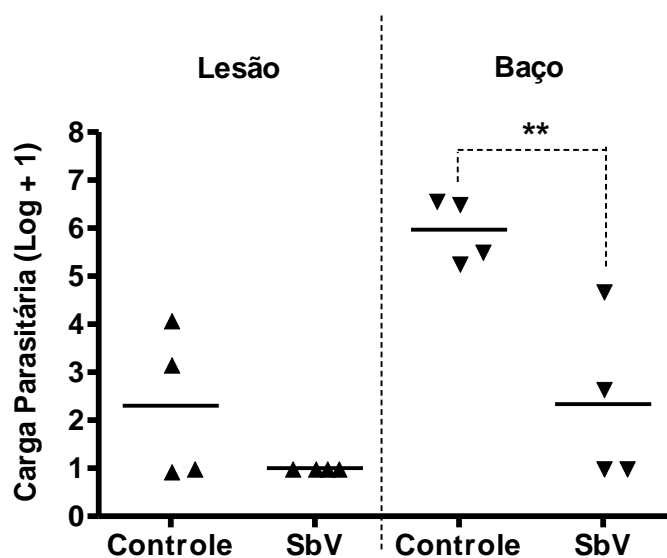


Figura 23 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado 2889 CLIOC. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de tecido.

** $p < 0,01$ comparado com o grupo controle.

Para os oito isolados que apresentaram o *padrão persistência*, a dose de 50 mg Sb^V/Kg/dia, durante 20 dias, foi eficaz para a total cicatrização das lesões. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle e tratado, a partir de D14, para seis isolados. Para os outros dois (LPC09 e 2889 CLIOC) a diferença foi verificada apenas após D21.

Em relação à carga parasitária remanescente na lesão dos grupos controle, verificou-se que os grupos de cinco isolados apresentaram número de parasitos superior a 10^4 , enquanto que nos demais, ela foi inferior a 10^3 . Para a carga parasitária remanescente observada nas lesões dos grupos tratados, foi observado que para apenas dois isolados (ML e 2889 CLIOC) não apresentaram redução significativa do número de parasitos do grupo tratado quando comparado ao grupo controle ($p > 0,05$). No entanto, para o isolado 2889 CLIOC, verificou-se ausência total de parasitos no sítio da lesão dos animais tratados, mostrando uma redução superior a 100 vezes da carga parasitária, quando comparado ao grupo controle. Os grupos tratados de todos os isolados apresentaram redução significativa na carga parasitária do baço quando comparados aos respectivos grupos controle ($p < 0,05$).

As figuras 23 a 32 apresentam a evolução no tamanho de lesão dos animais infectados com cinco isolados que apresentaram o *padrão regressão* e a análise da carga parasitária pós-tratamento na lesão e no baço desses animais.

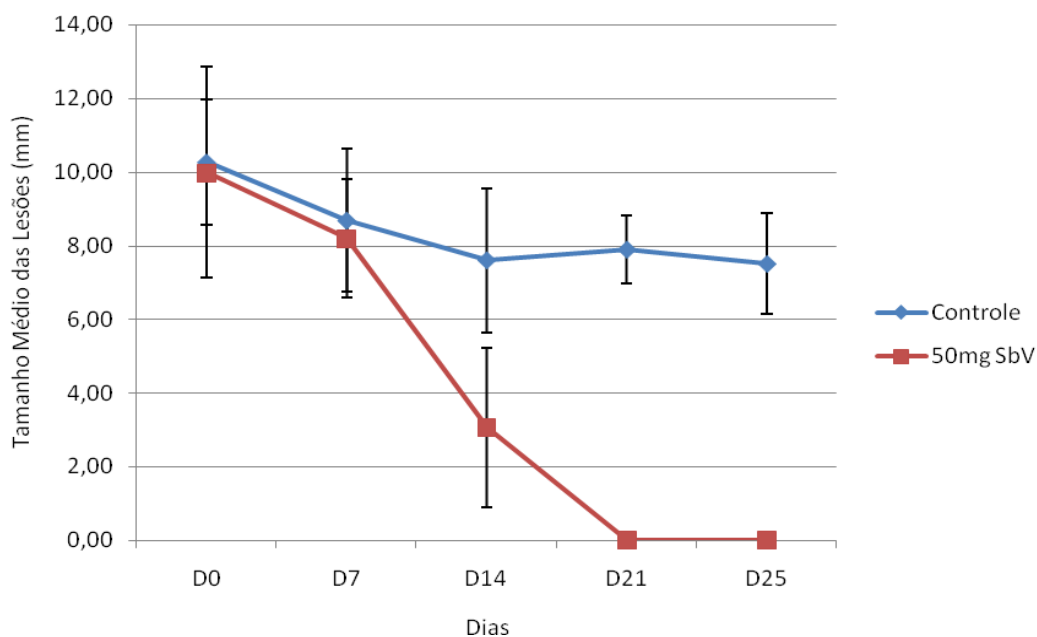


Figura 24 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC08. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. Houve diferença significativa entre o grupo controle e o tratado, p < 0,05, a partir de D14.

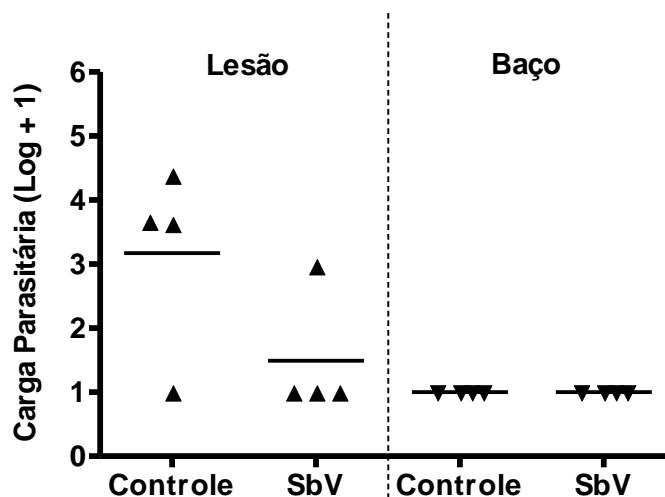


Figura 25 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC08. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de tecido. Não houve diferenças significativas entre os grupos.

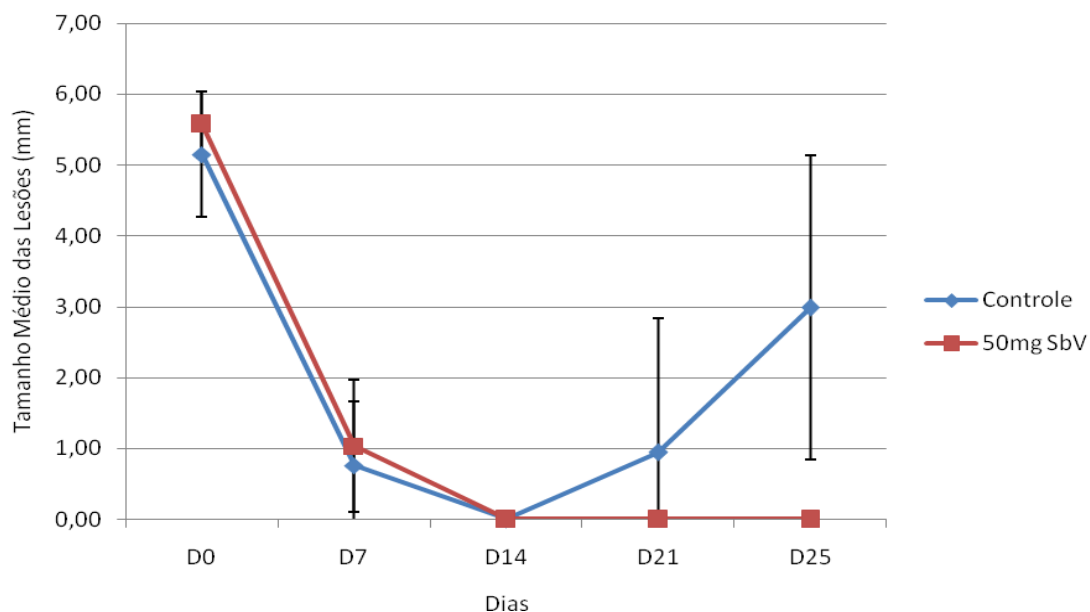


Figura 26 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC06. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. Houve diferença significativa entre o grupo controle e o tratado, $p > 0,05$, apenas em D25.

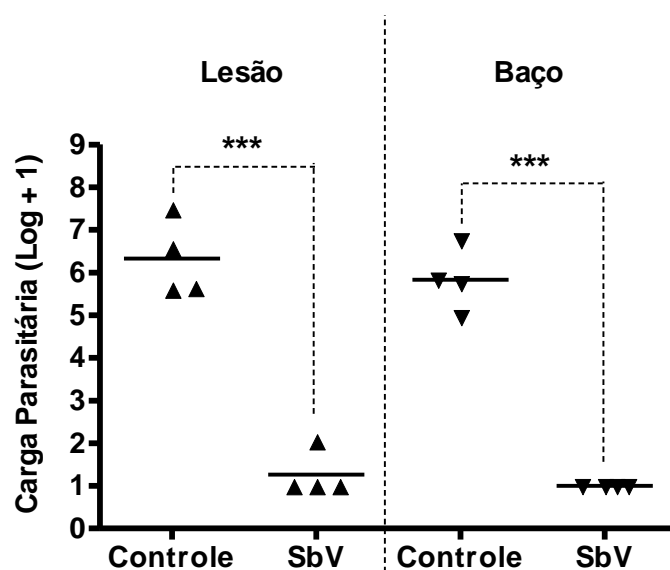


Figura 27 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC06. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de tecido.

*** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle.

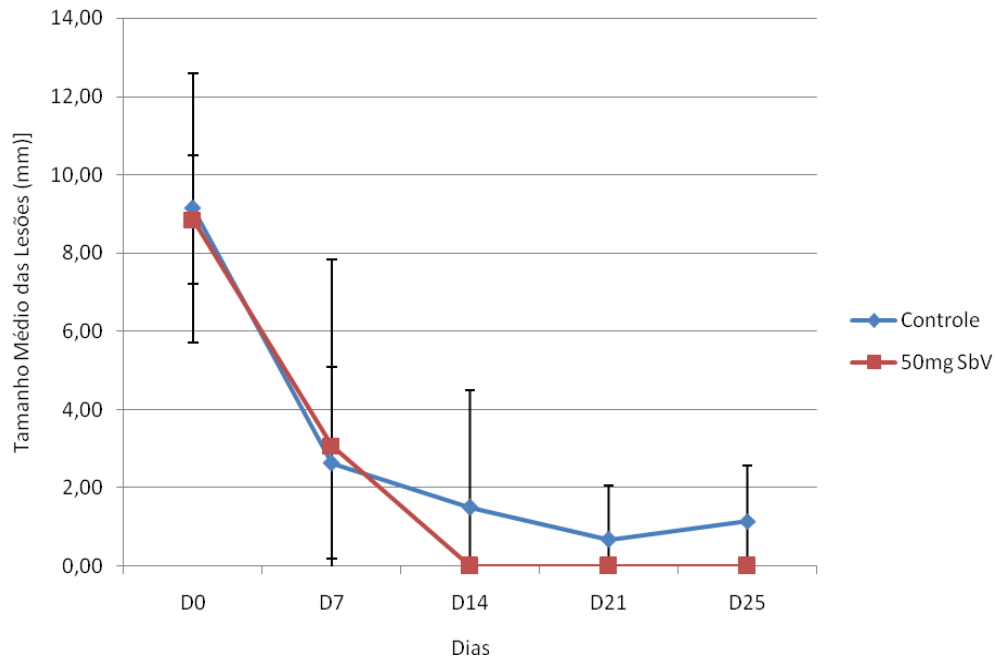


Figura 28 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC07. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. Não houve diferença significativa entre o grupo controle e o tratado em nenhum momento.

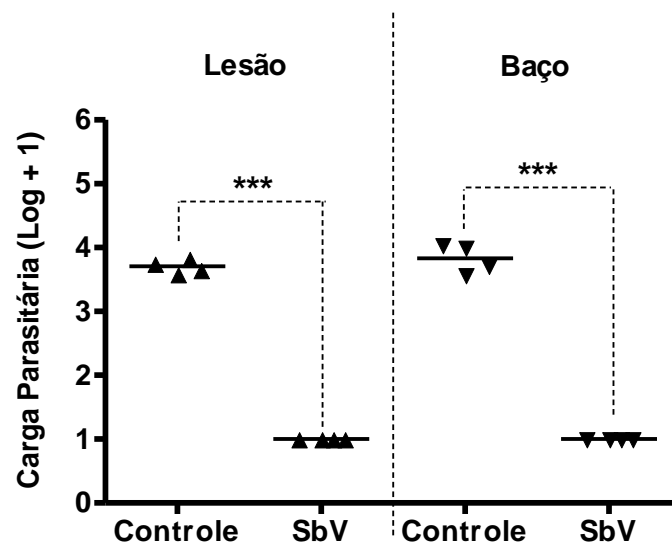


Figura 29 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC07. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de tecido.

*** p < 0,001 comparado com o grupo controle.

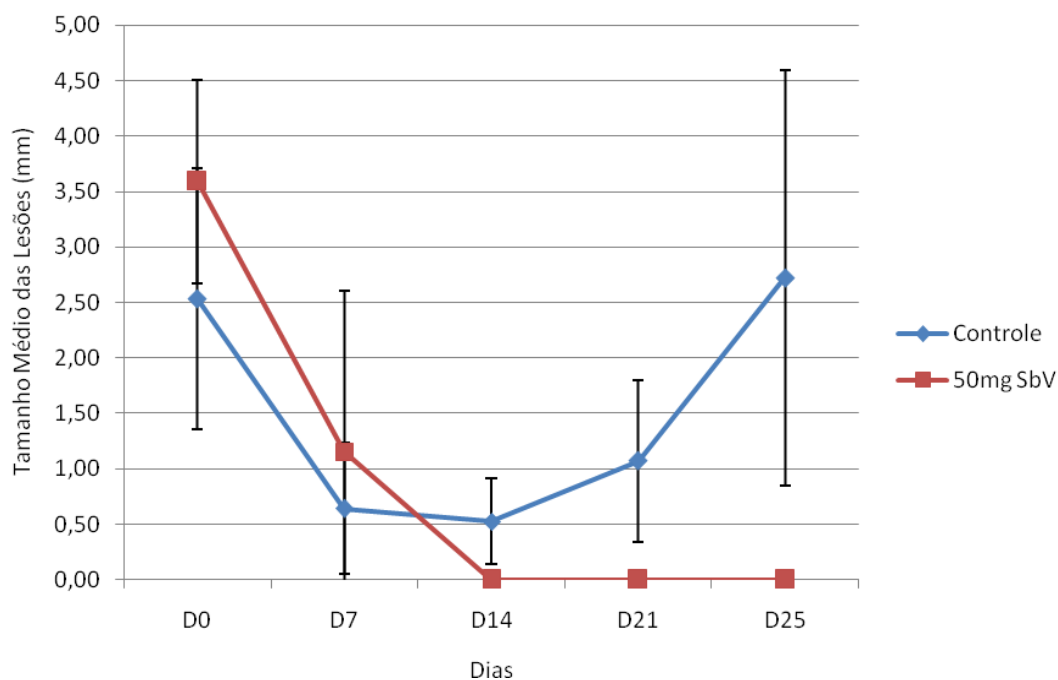


Figura 30 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC10. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. Houve diferença significativa entre o grupo controle e o tratado, p < 0,05, apenas em D25.

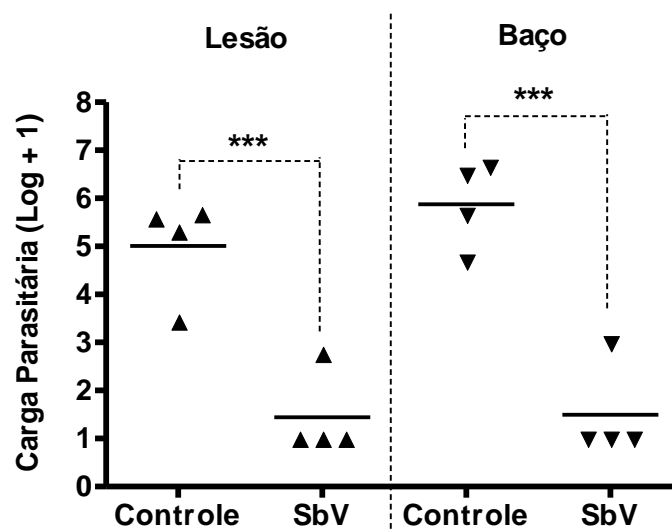


Figura 31 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC10. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de tecido.

** p < 0,01 e *** p < 0,001 comparado com o grupo controle.

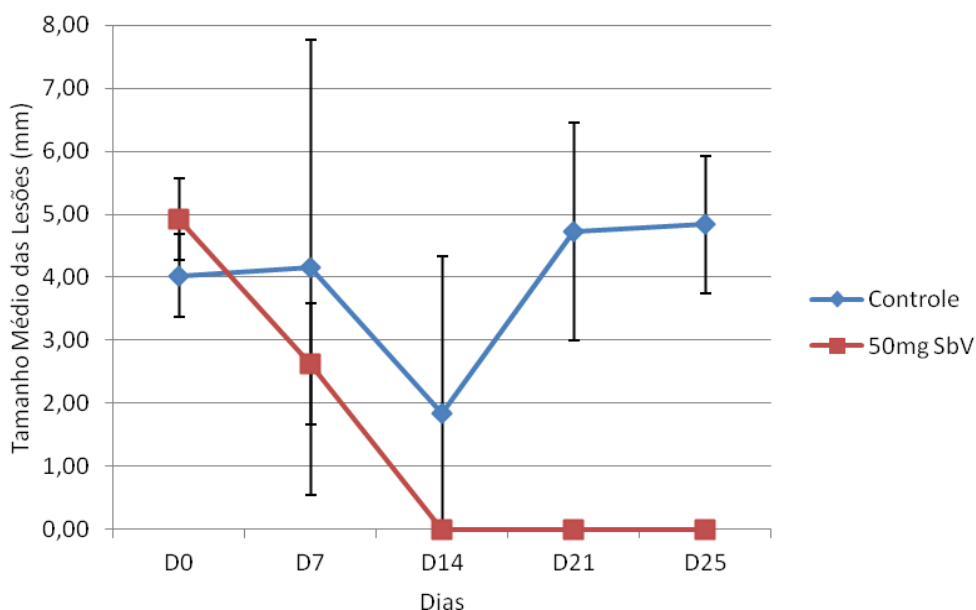


Figura 32 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC11. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. Houve diferença significativa entre o grupo controle e o tratado, p < 0,05, a partir de D21.

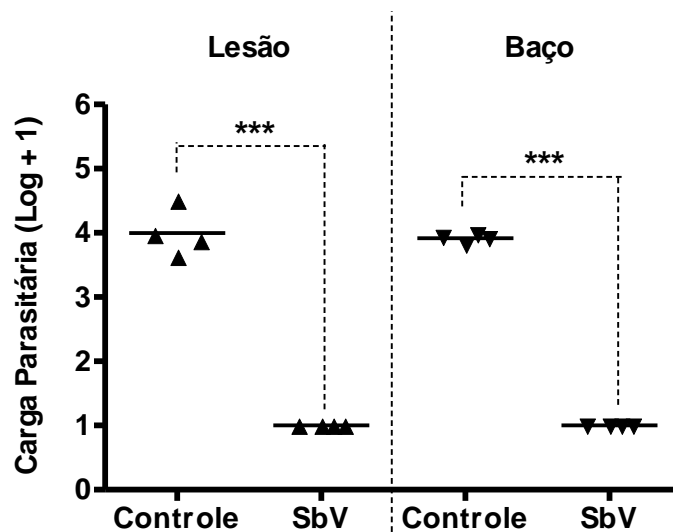


Figura 33 – Carga parasitária pós-tratamento nas lesões e baços de hamsters infectados com isolado LPC11. Os animais (n=4) receberam, por via IM, 50mg Sb^V/Kg/dia ou salina (grupo controle), por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de tecido.

* p < 0,05 e *** p < 0,001 comparado com o grupo controle.

Também para os cinco isolados que apresentaram o *padrão regressão*, a dose de 50 mg Sb^V/Kg/dia, durante 20 dias, foi eficaz para a total cicatrização das lesões. No que se refere à evolução do tamanho de lesão, apenas o isolado LPC08 apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle e tratado, a partir de D14. Para o isolado LPC11 a diferença ocorreu após D21, para LPC06 e LPC10 apenas em D25 e para o isolado LPC07 ela não ocorreu em nenhum momento do experimento.

Em relação à carga parasitária remanescente na lesão dos grupos controle, verificou-se que, para dois isolados, o número de parasitos foi superior a 10^4 , enquanto que para três ela foi inferior a 10^3 . Para a carga parasitária remanescente nas lesões e baços dos grupos tratados, foi observado que para apenas um isolado (LPC08) não houve redução significativa do número de parasitos nas lesões do grupo tratado quando comparado ao grupo controle ($p > 0,05$). Apesar disso, não foram verificados parasitos no sítio das lesões desses animais tratados. Esse foi o único isolado para o qual os animais do grupo controle apresentaram ausência total de parasitos no baço.

A Figura 33 mostra a evolução da doença entre os grupos controle dos diferentes isolados e da cepa referência M2903. Observa-se grande variação no comportamento desses isolados em modelo *in vivo*.

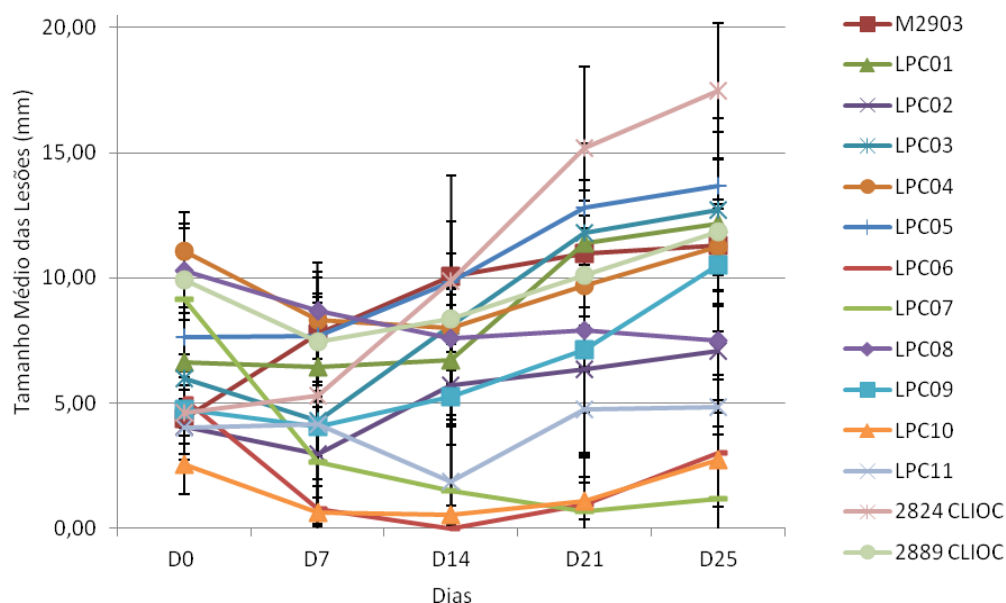


Figura 34 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com diferentes isolados de *Leishmania* spp. e com a cepa referência M2903. Todos os animais receberam salina, por via IM.

Ao comparar a carga parasitária persistente nas lesões dos animais dos grupos controle, no fim do experimento, entre isolados e a cepa referência M2903, observou-se que a quantidade de parasitos para os isolados LPC04, LPC07, LPC08, LPC11, 2824 e 2889 foi significativamente menor. Em relação à carga parasitária persistente nos baços desses mesmos animais, apenas para o isolado LPC08 a quantidade de parasitos foi significativamente menor, quando comparada àquela encontrada para a cepa M2903 (Figuras 34 e 35).

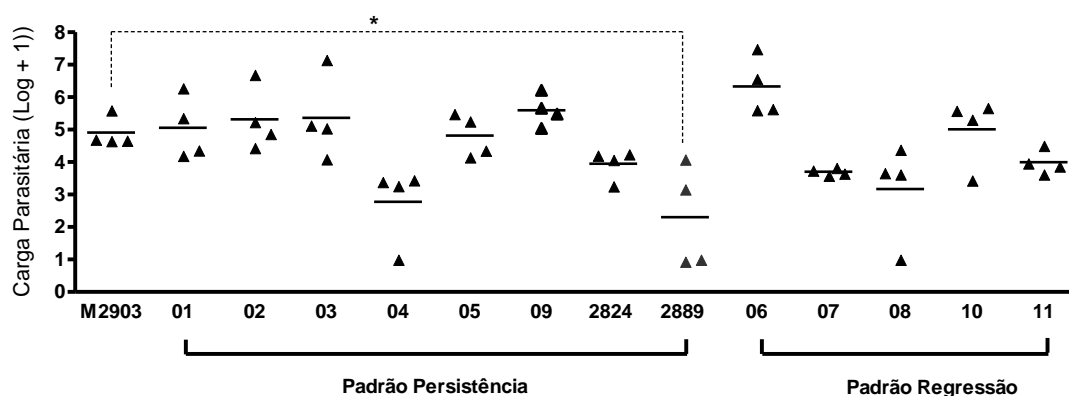


Figura 35 – Carga parasitária persistente nas lesões de hamsters infectados com diferentes isolados (LPC01 a LPC11, 2824 E 2889) de *Leishmania* spp. e com a cepa referência M2903 e não tratados (Grupos Controle). A carga parasitada foi normalizada por grama (g) de lesão.* $p < 0,05$

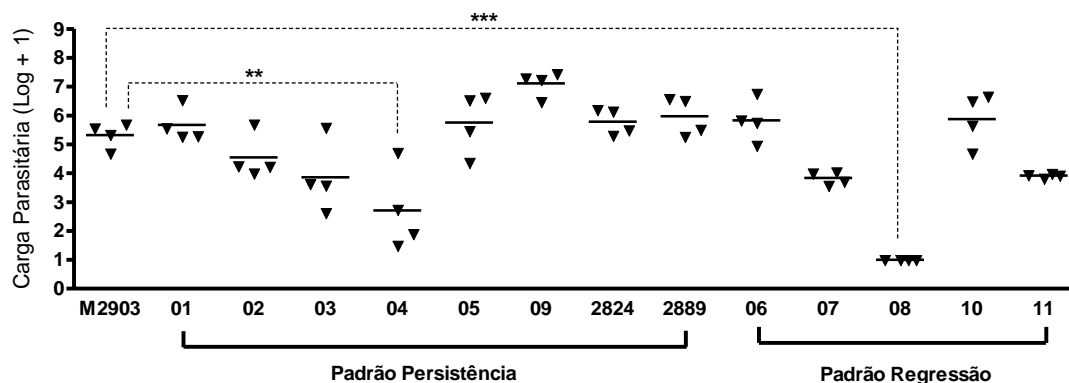


Figura 36 – Carga parasitária persistente nos baços de hamsters infectados com diferentes isolados (LPC01 a LPC11, 2824 E 2889) de *Leishmania* spp. e com a cepa referência M2903 e não tratados (Grupos Controle). A carga parasitada foi normalizada por grama (g) de baço.

** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

Tanto os isolados que apresentaram o *padrão persistência* quanto aqueles que apresentaram o *padrão regressão* mostraram-se sensíveis ao tratamento com 50 mg

Sb^V/Kg/dia, por 20 dias. A Figura 36 apresenta o comportamento diferenciado dos isolados em comparação com a cepa referência M2903, quando submetidas, *in vivo*, ao tratamento com antimoniato de meglumina.

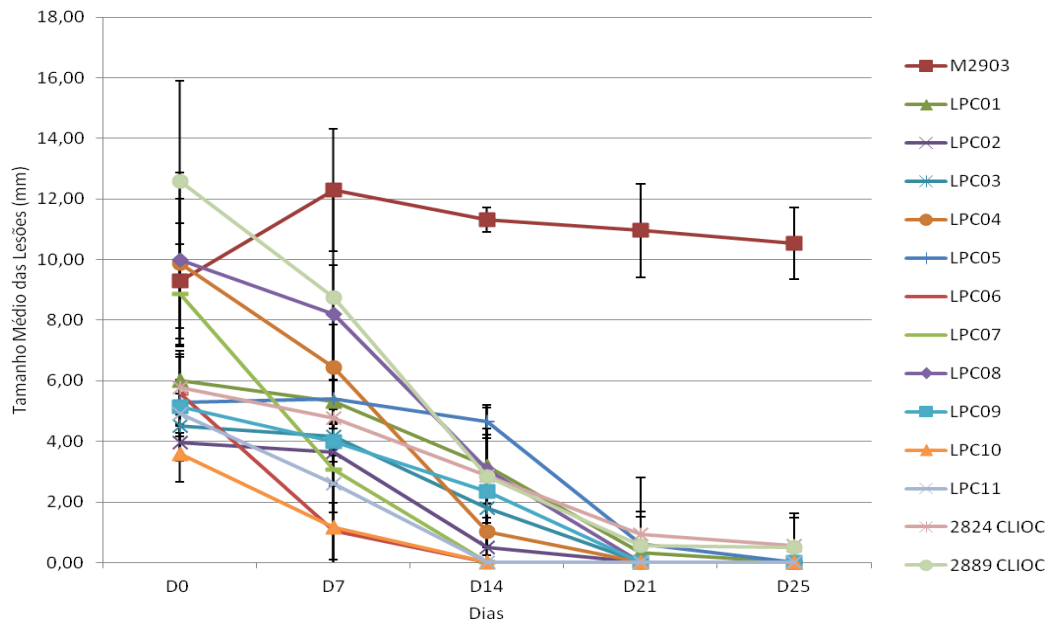


Figura 37 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com diferentes isolados de *Leishmania* spp. e com a cepa referência M2903. Os animais foram tratados por via IM com 50mg Sb^V/Kg/dia, por 20 dias. Em comparação à cepa M2903 houve diferença significativa ($p < 0,05$) para todos isolados, a partir de D7, exceto para os isolados LPC08 e 2889CLIOC, em que a diferença ocorreu a partir de D14.

Para os animais dos grupos tratados, apenas aqueles do grupo do isolado ML não apresentaram carga parasitária no sítio da lesão significativamente menor quando comparada ao do grupo da cepa M2903. Para a maioria dos isolados, a redução da carga parasitária tanto no sítio da lesão quanto no baço foi bastante expressiva, a ponto de nenhum parasito ser encontrado após a diluição limitante. Apenas o isolado APS apresentou persistência de infecção no baço, após tratamento *in vivo* com antimoniato de meglumina, com carga parasitária significativamente superior ($p < 0,05$) àquela observada para a cepa M2903 (Figuras 37 e 38).

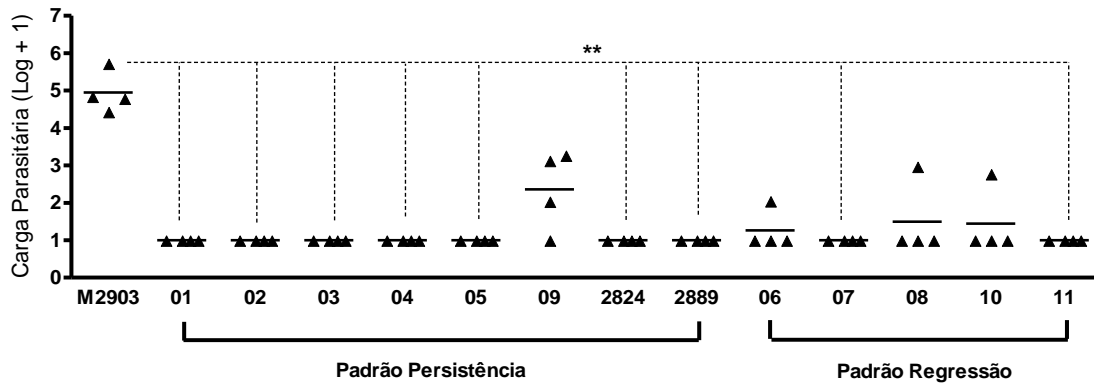


Figura 38 – Carga parasitária remanescente nas lesões de hamsters infectados com diferentes isolados (LPC01 a LPC11, 2824 e 2889) de *Leishmania* spp. e com a cepa referência M2903 e tratados com 50mg Sb^V/Kg/dia, por 20 dias. A carga parasitada foi normalizada por grama (g) de lesão. ** p < 0,01 e *** p < 0,001

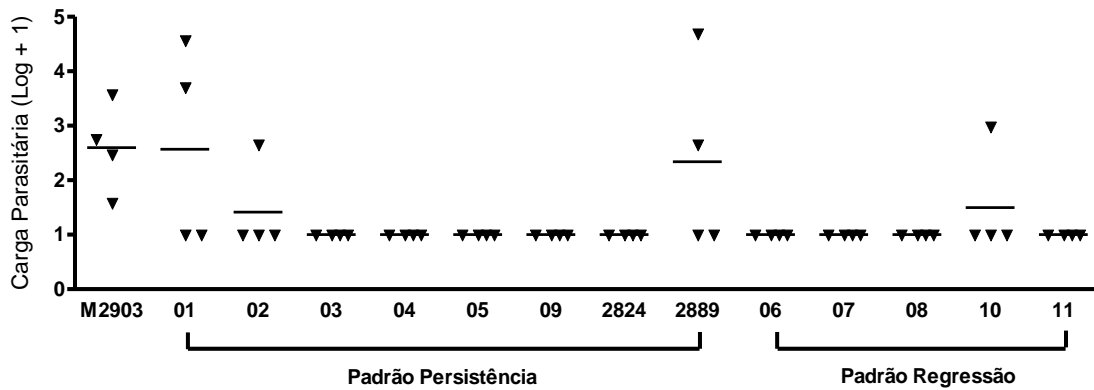


Figura 39 – Carga parasitária remanescente nos baços de hamsters infectados com diferentes isolados (LPC01 a LPC11, 2824 e 2889) de *Leishmania* spp. e com a cepa referência M2903 e tratados com 50mg Sb^V/Kg/dia, por 20 dias. A carga parasitada foi normalizada por grama (g) de baço. * p < 0,05

4.2 - Avaliação da Atividade *in vivo* da combinação Sb^V + Gel de PA em Isolados de *Leishmania* spp.

Os isolados LPC01, LPC03 e LPC05 foram escolhidos para avaliação da atividade *in vivo* da combinação antimoniato de meglumina (25mg Sb^V/Kg/dia, por 20 dias) e paromomicina-gel (100μL, 2x ao dia, por 20 dias). Essa escolha se deu porque os animais infectados com esses isolados apresentaram o *padrão persistência*. Além desses isolados, avaliou-se também a eficácia dessa combinação em hamsters infectados com a cepa M2903.

A Figura 39 mostra a evolução do diâmetro médio das lesões nos animais infectados com *L. (V.) braziliensis* M2903, após o início do tratamento em função do tempo (dias). Apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) no tamanho médio das lesões, quando comparados ao grupo controle, a partir de D21, os animais que receberam tratamento com a associação Sb^V + PA. Já os animais tratados isoladamente com paromomicina tópica apresentaram redução significativa apenas em D25.

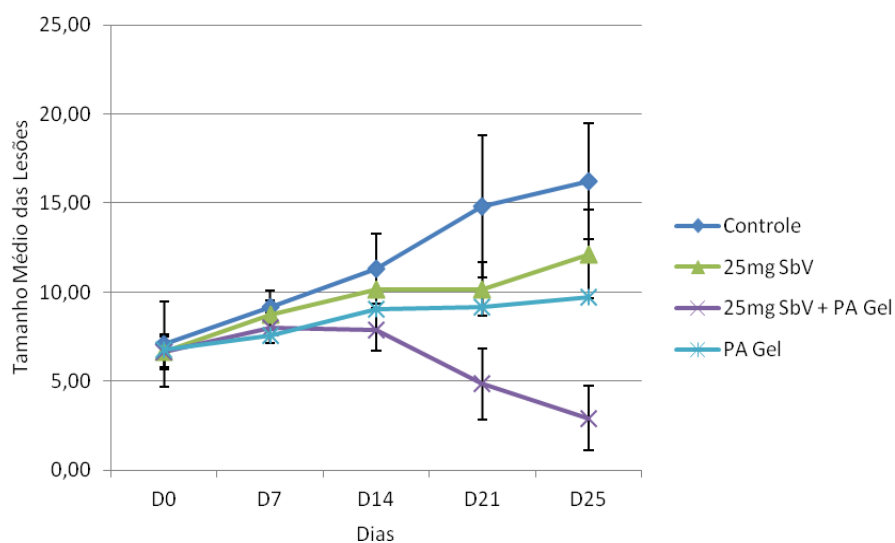


Figura 40 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com cepa referência M2903 e tratados com 25mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias. Em comparação ao grupo controle, houve diferença significativa ($p < 0,05$) para a associação Sb-PA, a partir de D21 e para PA Gel em D25.

Nenhum dos tratamentos mostrou-se efetivo para reduzir significativamente o tamanho da lesão; enquanto no baço a redução foi verificada apenas nos grupos que

receberam antimoniato de meglumina isolado ($p < 0,05$) e associado à paromomicina-gel ($p < 0,05$). Vide Figuras 40 e 41.

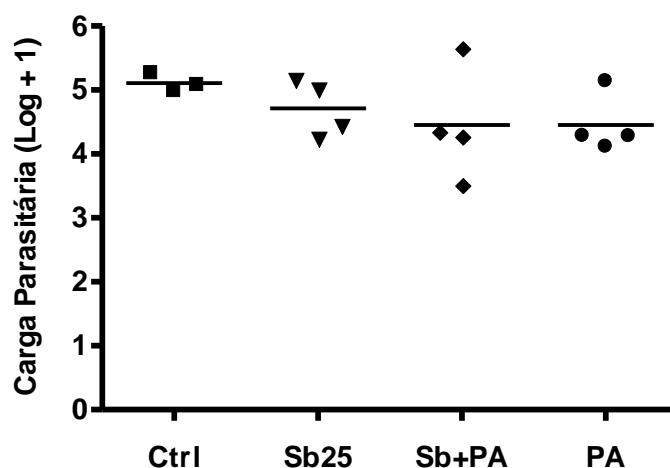


Figura 41 - Carga parasitária pós-tratamento nas lesões de hamsters infectados com a cepa M2903. Os animais foram tratados com 25mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias, por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de lesão.

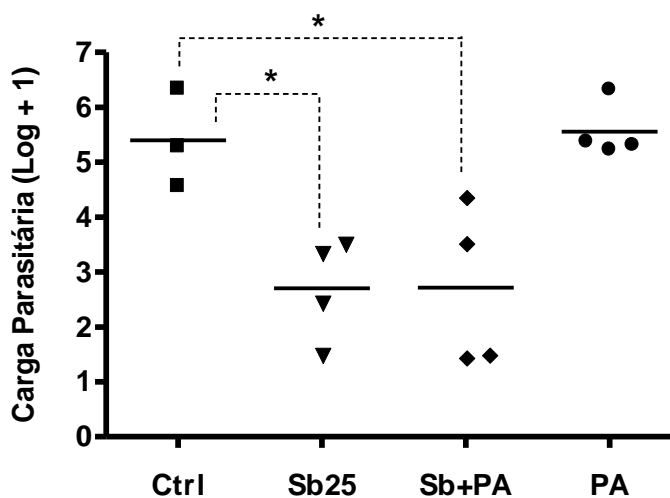


Figura 42 - Carga parasitária pós-tratamento nos baços de hamsters infectados com a cepa M2903. Os animais foram tratados com 25mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de baço. * $p < 0,05$

Todos os isolados de *Leishmania* utilizados para avaliação da eficácia da associação Sb^V + PA foram bastante sensíveis à dose de 25 mg Sb^V/Kg/dia isolada. Isso prejudicou a análise da associação, uma vez que a evolução no tamanho médio das lesões mostrou resultado igualmente favorável para ambos os esquemas terapêuticos.

A Figura 42 apresenta o acompanhamento do tamanho médio das lesões durante o tratamento dos hamsters infectados com o isolado LPC01.

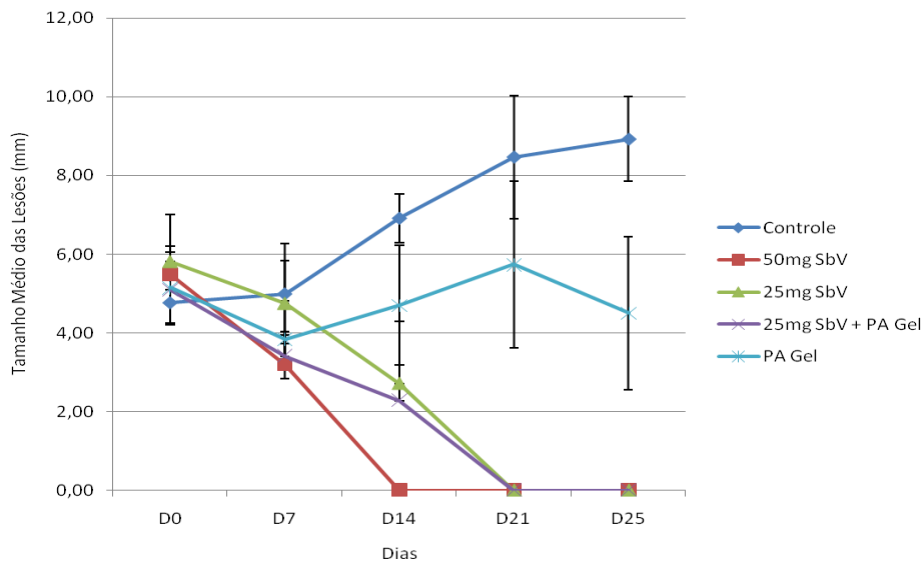


Figura 43 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC01 e tratados com 50mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias. Em comparação ao grupo controle, houve diferença significativa ($p < 0,05$) para 50mg SbV, 25mg SbV e 25mg SbV + PA Gel, a partir de D14, e para PA Gel a partir de D21.

Houve redução significativa do diâmetro médio das lesões, quando comparado ao do grupo controle, para os grupos 50mg SbV, 25mg SbV e 25mg SbV + PA Gel, a partir de D14. Essa redução foi significativa a partir de D21 para o grupo que recebeu somente paromomicina.

Em relação à redução da carga parasitária no sítio da lesão, ela apenas foi significativa para o grupo que recebeu 50 mg Sb^V/Kg/dia, por 20 dias ($p < 0,001$). Interessante observar que, em comparação ao grupo que recebeu 25mg SbV/Kg/dia isoladamente, a associação Sb^V- PA não foi eficaz na redução da carga parasitária no sítio da lesão (Figura 43).

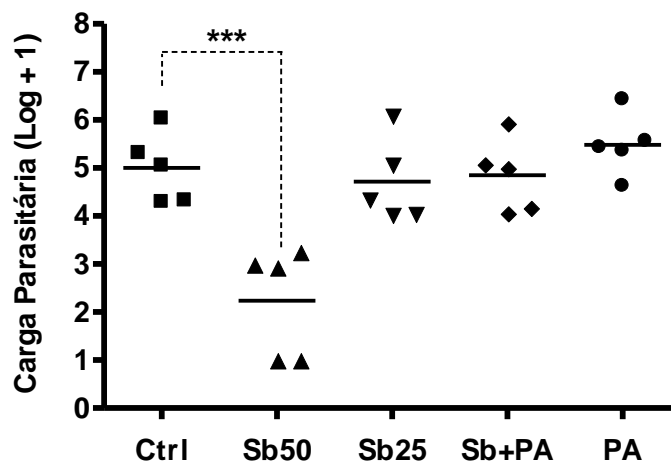


Figura 44 - Carga parasitária pós-tratamento nas lesões de hamsters infectados com o isolado LPC01. Os animais foram tratados com 50mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de lesão. *** p < 0,001

Para o baço, a redução da carga parasitária aconteceu nos grupos 50mg Sb^V, 25mg Sb^V e 25mg Sb^V + PA Gel (todos com p < 0,001). Vide Figura 44.

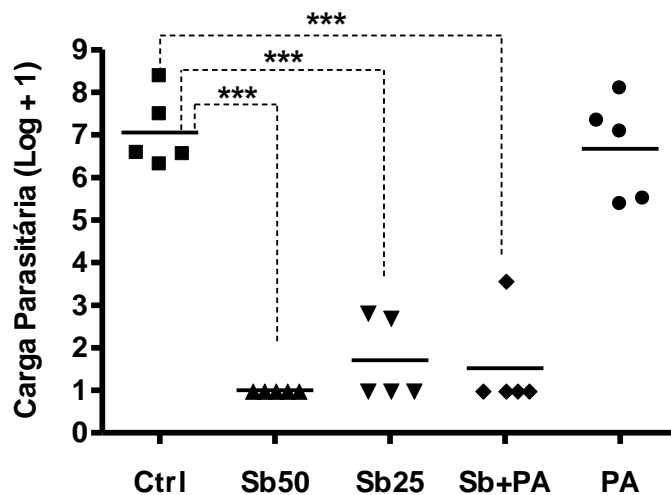


Figura 45 - Carga parasitária pós-tratamento nos baços de hamsters infectados com o isolado LPC01. Os animais foram tratados com 50mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de baço. *** p < 0,001

Os animais infectados com o isolado LPC03 apresentaram evolução no tamanho das lesões conforme mostrado na Figura 45. A redução nos diâmetros médios foi

significativa entre o grupo controle e os grupos 50mg SbV e PA Gel, a partir de D7. Para os demais, a partir de D14.

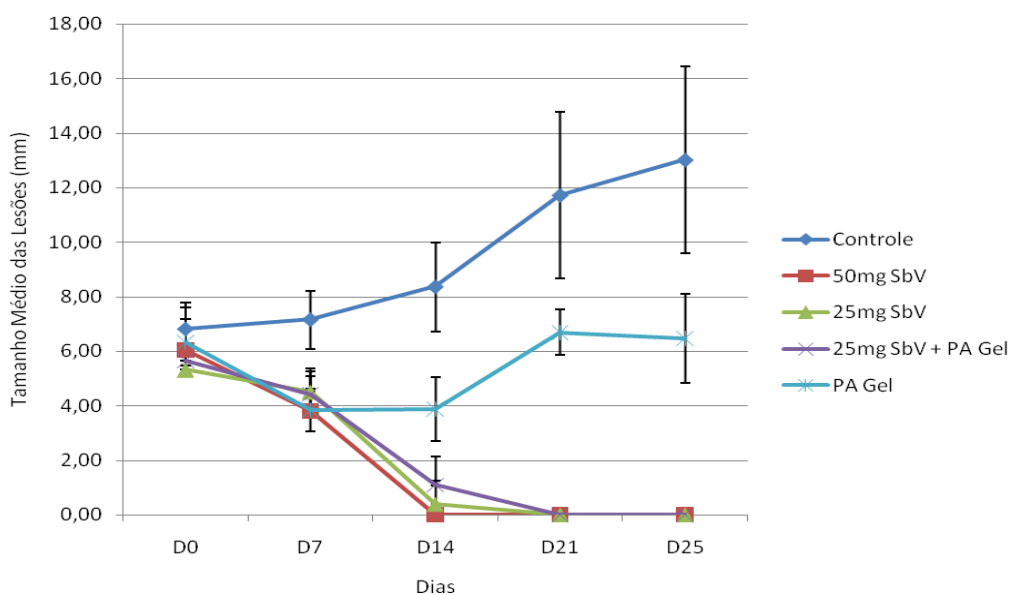


Figura 46 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC03 e tratados com 50mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias. Em comparação ao grupo controle, houve diferença significativa ($p < 0,05$) para os grupos 50mg Sb^V e PA Gel, a partir de D7, e para os grupos 25mg Sb^V e 25mg Sb^V + PA Gel, a partir de D14.

Em relação à carga parasitária, houve redução significativa no sítio de lesão ($p < 0,001$) e no baço ($p < 0,05$) dos animais dos grupos 50mg Sb^V, 25mg Sb^V e 25mg Sb^V + PA Gel, conforme mostrado nas Figuras 46 e 47.

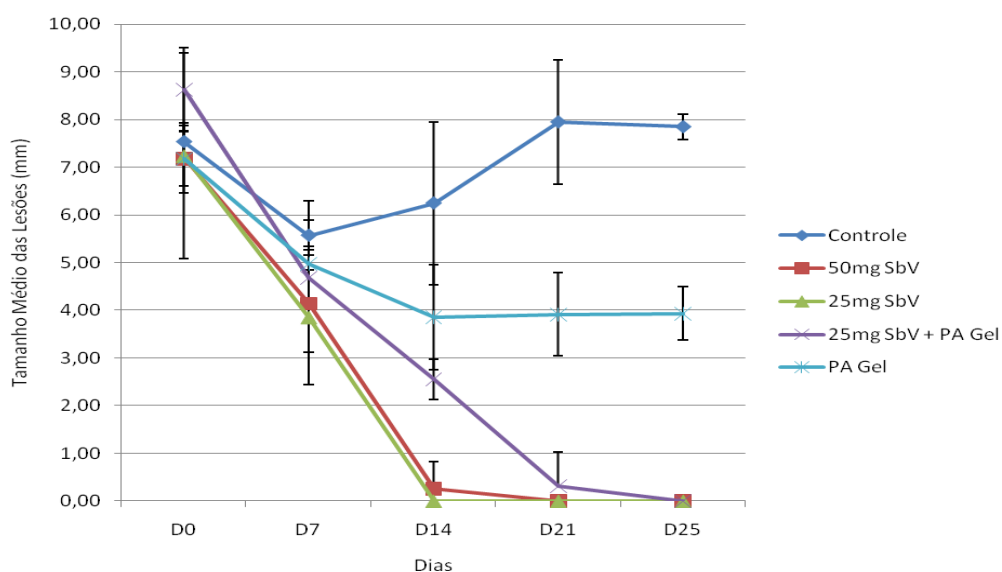


Figura 49 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com isolado LPC05 e tratados com 50mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias. Em comparação ao grupo controle, houve diferença significativa ($p < 0,05$) para todos os outros grupos a partir de D14.

Com relação à carga parasitária no sítio da lesão, houve redução significativa para os grupos tratados com 50 mg Sb^V/Kg/dia ($p < 0,001$) e com a associação 25 mg Sb^V/Kg/dia + paromomicina-gel ($p < 0,001$). O mesmo não foi verificado no grupo tratado com a dose de 25 mg Sb^V/Kg/dia isoladamente ($p > 0,05$). No baço, os grupos tratados com 50 mg Sb^V/Kg/dia, 25 mg Sb^V/Kg/dia e 25 mg Sb^V/Kg/dia + paromomicina-gel apresentaram redução significativa da carga parasitária ($p < 0,001$) para todos. Vide Figuras 49 e 50.

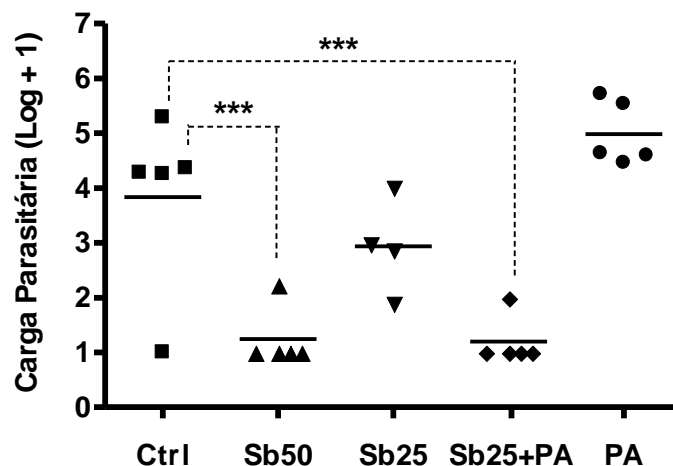


Figura 50 - Carga parasitária pós-tratamento nas lesões de hamsters infectados com o isolado LPC05. Os animais foram tratados com 50mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de lesão. *** p < 0,001

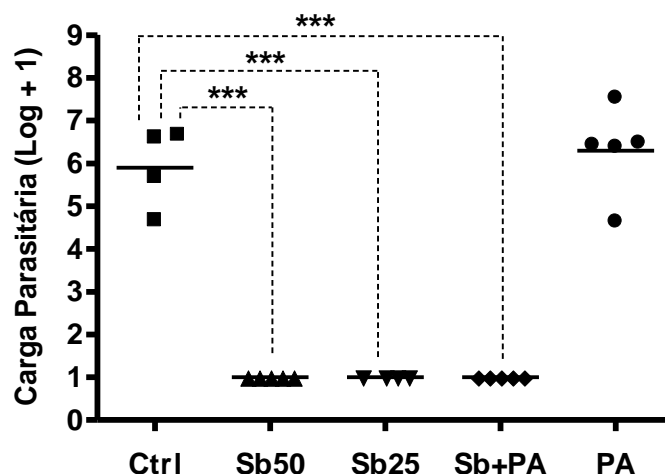


Figura 51 - Carga parasitária pós-tratamento nos baços de hamsters infectados com o isolado LPC05. Os animais foram tratados com 50mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia, 25mg Sb^V/Kg/dia + Gel de PA e Gel de PA, por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de baço. *** p < 0,001

Dentro do estudo de associação foi possível realizar, novamente, a análise da sensibilidade ao antimoniato de meglumina dos isolados, bem como da sensibilidade à paromomicina-gel e de sua combinação com o Sb^V.

Todos os animais infectados com os isolados e tratados com a dose de 25 mg Sb^V/Kg/dia, por 20 dias, apresentaram cicatrização da lesão, enquanto os animais

infectados com a cepa M2903 apresentaram persistência. Houve diferença significativa ($p < 0,001$) na evolução da lesão provocada pelos isolados quando comparada à evolução observada para a cepa M2903 a partir de D7 (Figura 51). Em relação à carga parasitária nos tecidos analisados, apenas não houve redução significativa no sítio de lesão dos animais infectados com o isolado LPC01 (Figura 52).

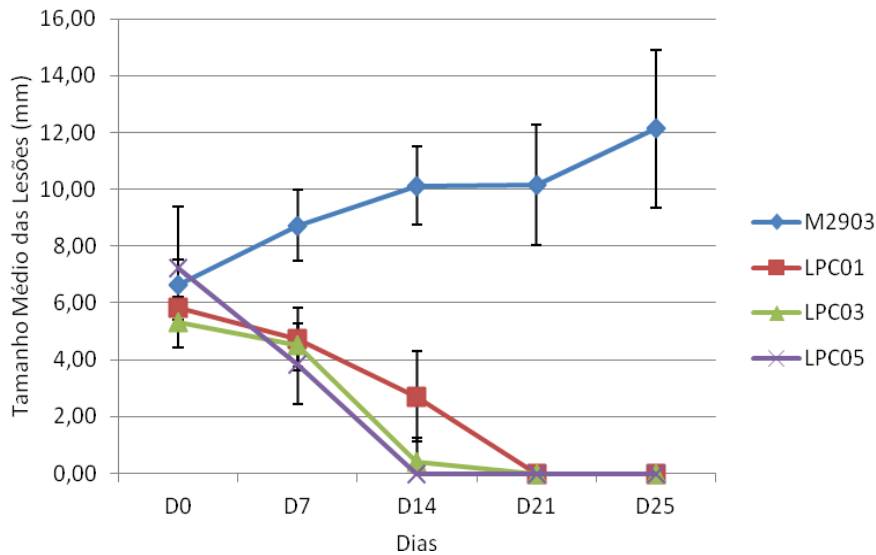


Figura 52 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com diferentes isolados de *Leishmania* spp. e com a cepa referência M2903. Os animais foram tratados por via IM com 25mg Sb^V/Kg/dia, por 20 dias. Em comparação à cepa M2903, houve diferença significativa para todos os isolados, a partir de D7.

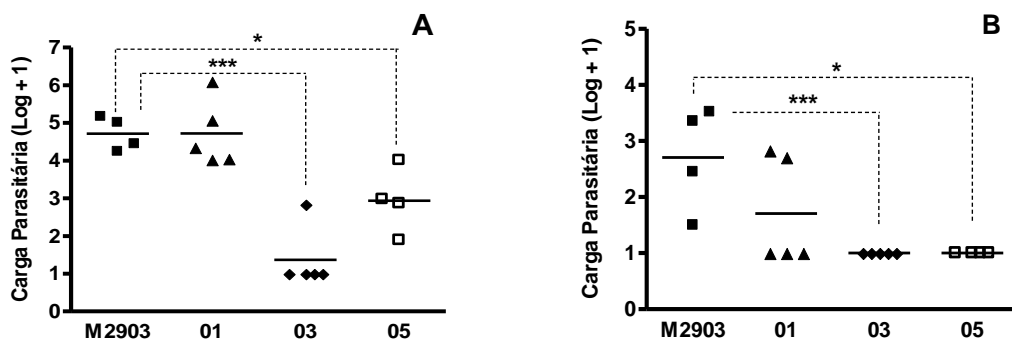


Figura 53 – Carga parasitária remanescente nas lesões (A) e baços (B) de hamsters infectados com diferentes isolados de *Leishmania* spp. e com a cepa referência M2903 e tratados com 25mg Sb^V/Kg/dia, por 20 dias. A carga parasitada foi normalizada por grama (g) de tecido. * $p < 0,05$ e * $p < 0,001$**

Os animais tratados isoladamente com a aplicação tópica de paromomicina-gel, 2 vezes ao dia, por 20 dias, apresentaram a evolução da lesão conforme mostrada na Figura 53. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os isolados e a cepa M2903, a partir de D7. Esses dados indicam maior sensibilidade *in vivo* à paromomicina dos isolados de *Leishmania* spp. em comparação à cepa referência. A aplicação do gel de PA não foi eficaz na redução do parasitismo na lesão e no baço (Figura 54)

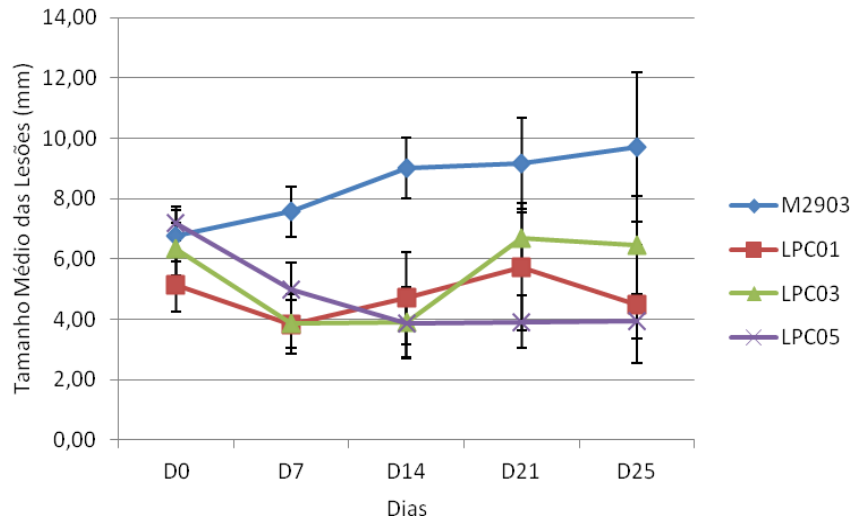


Figura 54 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com diferentes isolados de *Leishmania* spp. e com a cepa referência M2903. Os animais foram tratados por via tópica com 100µL de gel de paromomicina, duas vezes ao dia, por 20 dias. Em comparação à cepa M2903, houve diferença significativa para todos os isolados, $p < 0,05$, a partir de D7.

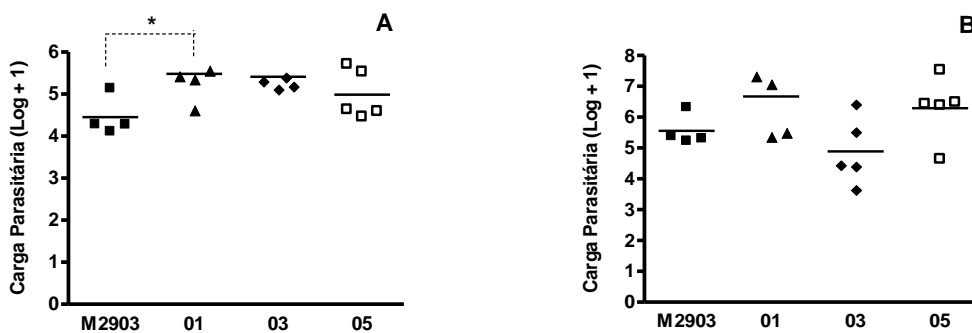


Figura 55 – Carga parasitária remanescente nas lesões (A) e baços (B) de hamsters infectados com diferentes isolados de *Leishmania* spp. e com a cepa referência M2903 e tratados por via tópica com 100µL de gel de paromomicina, duas vezes ao dia, por 20 dias. A carga parasitada foi normalizada por grama (g) de tecido. * $p < 0,05$

Finalmente, a comparação da evolução da doença entre os animais infectados com os isolados e com a cepa M2903, tratados com associação Sb^V + paromomicina-gel, mostrou diferença significativa ($p > 0,05$) a partir de D7. Já o parasitismo mostrou-se persistente e significativamente não reduzido apenas no sítio de lesão dos animais infectados com o isolado LPC01 (Figuras 55 e 56).

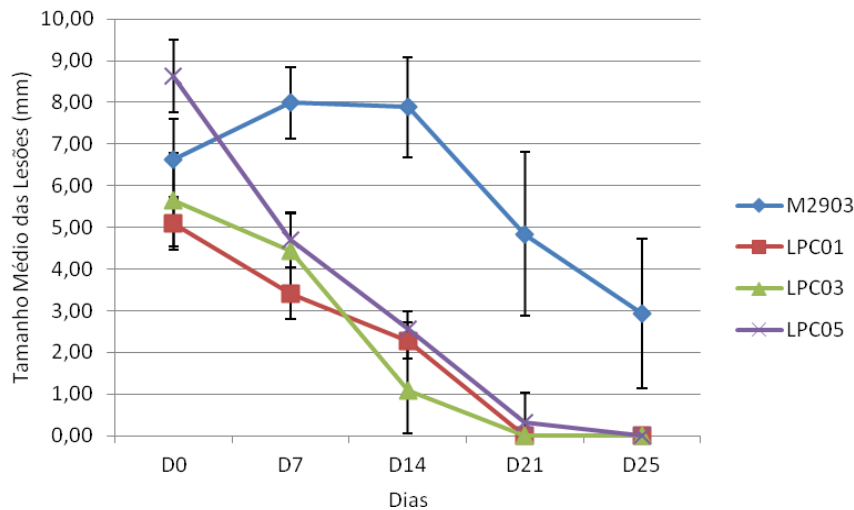


Figura 56 – Evolução no tamanho médio das lesões de hamsters infectados com diferentes isolados de *Leishmania* spp. e com a cepa referência M2903. Os animais foram tratados com a associação 25mg Sb^V /Kg/dia e 100µL de gel de paromomicina 10%, duas vezes ao dia, por 20 dias. Em comparação à cepa M2903, houve diferença significativa para os isolados, $p > 0,05$, a partir de D7.

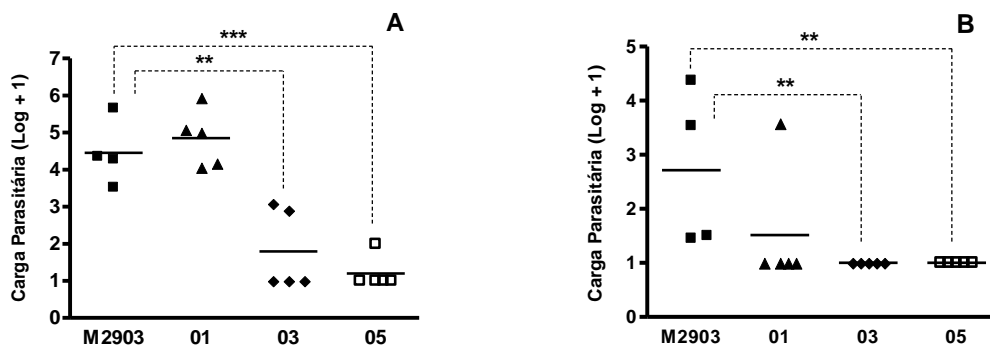


Figura 57 – Carga parasitária remanescente nas lesões (A) e baços (B) de hamsters infectados com diferentes isolados de *Leishmania* spp. e com a cepa referência M2903 e tratados com a associação 25mg Sb^V /Kg/dia e 100µL de gel de paromomicina 10%, duas vezes ao dia, por 20 dias. A carga parasitária foi normalizada por grama (g) de tecido. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

5 DISCUSSÃO

O primeiro objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade *in vivo* ao antimoniato de meglumina de *Leishmania* spp. isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea. Foram caracterizados como *Leishmania braziliensis* oito dos 11 isolados coletados por aspirado de lesão no Centro de Referência em Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ-MG). Nesse serviço, um estudo de casuística realizado por Rotondo (2007), entre os anos de 2001 a 2005, mostrou que a Região Metropolitana de Belo Horizonte correspondeu a 85% da procedência dos pacientes atendidos e que 95,8% dos parasitos isolados de lesão cutânea foram do subgênero *Viannia*. Esse dado vai ao encontro da literatura, que aponta prevalência de 92,5 % para esse subgênero (Passos *et al.*, 1999) e de 92,0% para a espécie *Leishmania braziliensis* nessa região (Profeta da Luz *et al.*, 2009). Três isolados não puderam ser caracterizados devido à contaminação das culturas, mas os dados epidemiológicos sugerem que sejam isolados de *L. (V.) braziliensis*. Além disso, todos os isolados apresentaram infecção característica em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) semelhante à observada com a cepa referência de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903. Os outros dois isolados usados neste trabalho foram enviados pela CLIOC já caracterizados como *L. (V.) braziliensis*, sendo um originário do município do Rio de Janeiro, RJ (2824) e o outro de Corte de Pedras, BA (2889).

Para a análise *in vivo*, todos os hamsters foram infectados com suspensão de amastigotas na ordem de 10^6 , na base da cauda por via intradérmica, conforme especificado no item 3.1.3. Esse modelo é interessante por permitir inóculo de maior infectividade e melhor persistência das lesões (Stauber *et al.*, 1966; Wilson *et al.*, 1979). O desenvolvimento da doença se deu com a presença de lesões ulceradas em todos os animais, variando o tamanho médio das lesões entre os isolados, antes do início do tratamento, em até seis vezes. Após o sacrifício dos animais e determinação da carga parasitária, observou-se uma grande variação na quantidade de parasitos persistentes nas lesões e baços dos animais que não receberam intervenção medicamentosa (grupos controle). Enquanto alguns isolados persistiam com o parasitismo na lesão na ordem de 10^6 , outros foram detectados na ordem de 10^2 . Em relação ao parasitismo no baço, apenas um isolado não apresentou visceralização, e a variação na carga parasitária para

os outros ocorreu da ordem de 10^6 para 10^0 . Acompanhando-se a evolução da doença nos animais não tratados, pôde-se dividi-la em dois padrões: um em que se observou aumento no tamanho da lesão e persistência da mesma em relação ao tempo, e outro em que os animais apresentaram diminuição significativa do tamanho de lesão ou sua cicatrização completa em algum momento. Uma vez que o modelo experimental de infecção e acompanhamento da evolução da doença foi o mesmo para todos os isolados, esses dados sugerem uma diferença significativa de infectividade e gravidade da doença produzida por eles, reforçando o que já havia sido descrito em outros estudos que avaliaram o comportamento de isolados de *L. (V.) braziliensis* em hamsters dourados (Kahl *et al.*, 1990; Rey *et al.*, 1990; Sinagra *et al.*, 1997). Essas diferenças poderiam ser explicadas de várias maneiras, dentre elas podemos destacar as limitações inerentes à técnica de infecção e as características intrínsecas dos parasitos.

A infecção por via intradérmica utilizando-se suspensão de amastigotas é uma técnica que não permite a quantificação exata dos parasitos inoculados. A contagem das amastigotas foi realizada através de câmara de Neubauer na diluição de 1000 vezes do macerado das lesões de vários hamsters. A inoculação dessa suspensão pode carrear para o sítio de inóculo, simultaneamente aos parasitos quantificados, outras células que podem conter parasitas, como macrófagos, bem como quimiocinas que apresentam papel importante no desenvolvimento da lesão cutânea. Assim, estimou-se uma quantidade da ordem de 10^6 parasitos por infecção, mas é possível que haja uma variação desse valor entre os experimentos realizados com os diferentes isolados de *Leishmania*.

Com relação às características intrínsecas aos parasitos, a imunomodulação provocada pelos diferentes isolados poderia ajudar a explicar a variação na infecção provocada por eles. Em humanos, a LCL e a LMC causadas por *L. (V.) braziliensis* mostram-se persistentes e associadas com intensa produção de citocinas do tipo 1 e acentuada migração de células inflamatórias mononucleares para o sítio da lesão, apesar de alguns pacientes apresentarem cura (Pirmez *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 1995). Além disso, uma ampla variação de manifestações clínicas é observada em pacientes portadores de leishmaniose cutânea, infectados por *L. (V.) braziliensis*. Na tentativa de compreender a complexa inter-relação entre o hospedeiro e as propriedades intrínsecas dos parasitos que contribuem para essa variedade de manifestações, Indiani de Oliveira *et al.* (2004) infectaram camundongos com dois isolados diferentes de *L. (V.) braziliensis*. Foram observadas manifestações clínicas distintas (desenvolvimento de

lesões detectáveis e não desenvolvimento de lesão) com diferentes padrões de produção de citocinas. Entretanto, não foram observadas diferenças na carga parasitária no sítio de inoculação e nos linfonodos satélites. Características intrínsecas dos parasitos que conferem capacidade aumentada de sobrevivência em macrófagos humanos, como resistência ao óxido nítrico em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, foram associadas com formas mais graves da doença (Giudice *et al.*, 2007). Costa *et. al* (2011) demonstraram *in vivo* que, em adição à resistência ao óxido nítrico, a imunomodulação através da resposta tipo 2 induzida por certas cepas de *L. (V.) braziliensis*, pode contribuir para o aumento da gravidade da lesão, da carga parasitária e da duração da doença. Basicamente, em presença de IFN- γ , a produção de IL-4 aumenta a expressão de arginase I e prejudica a morte dos parasitos no sítio da lesão. Apesar desses achados, o verdadeiro mecanismo que modula a susceptibilidade à *L. (V.) braziliensis* permanece pouco compreendido. No nosso trabalho, foram verificados padrões diferentes de persistência da infecção, em hamster dourados, causada por diferentes isolados de *Leishmania* de área endêmica para *L. (V.) braziliensis*. A pesquisa dos aspectos imunopatológicos presentes nas lesões desses animais poderia ajudar na compreensão dessas diferenças e na elucidação de alvos imunológicos para o controle da infecção por esses parasitos.

A análise de sensibilidade a fármacos é classicamente realizada em modelos *in vitro*. Para isolados de *L. (V.) braziliensis*, o modelo mais utilizado consiste na submissão de amastigotas intracelulares a diferentes concentrações do fármaco para cálculo da concentração inibitória de 50% dos parasitos (CI₅₀) e sua comparação com a CI₅₀ da cepa referência de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903. Se o valor de CI₅₀ encontrado para o isolado for maior que cinco vezes o valor da CI₅₀ encontrado para a cepa M2903, o isolado é considerado resistente; se for menor que duas vezes é considerado um isolado sensível (Yardley *et al.*, 2006). As análises realizadas com esse modelo e que tentaram associar a infecção por um isolado resistente com a falha terapêutica aos antimoniais na LTA, até o momento, são contraditórias. Questiona-se a adequação desses modelos como preditores da resposta terapêutica, uma vez que, sendo realizados *in vitro*, eles não consideram o sistema imune atuando sinergicamente com o fármaco. É possível que um estudo que buscasse avaliar a sensibilidade desses isolados em modelo *in vivo* fosse mais fiel ao prognóstico da resposta terapêutica observada no paciente. Além disso, esse tipo de modelo possibilitaria o estudo dos mecanismos

imunopatológicos estabelecidos diante da infecção por diferentes isolados e possivelmente modulados durante o tratamento. Por isso, avaliamos *in vivo* a sensibilidade ao antimoniato de meglumina. Comparamos a resposta frente à dose de 50 mg Sb^V/Kg/dia, por 20 dias, apresentada pelos isolados com a apresentada pela cepa de referência *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903. Sabe-se que, *in vitro*, a sensibilidade aos antimoniais entre isolados de pacientes portadores de LTA é muito variada. Oliveira-Silva (2010) trabalhando com isolados de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, atendidos no Centro de Referência em Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou, verificou que alguns isolados circulantes na região de Belo Horizonte precisavam de uma quantidade nove vezes superior de antimônio para reduzir em 50% a infecção em macrófagos murinos quando comparados entre si. No nosso trabalho, essa variação na sensibilidade ao antimoniato de meglumina não foi observada *in vivo*, uma vez que todos os isolados se apresentaram igualmente sensíveis ao tratamento realizado. Onze dos 13 isolados utilizados foram provenientes de pacientes portadores de LC que curaram com a terapêutica antimonial e a resposta terapêutica dos outros dois é desconhecida. Assim, verificou-se que a análise de sensibilidade *in vivo* ao antimoniato de meglumina dos isolados de *Leishmania braziliensis* foi próxima da resposta observada no tratamento dos pacientes.

Apesar de a análise da sensibilidade ao Sb^V *in vivo* ter se mostrado um modelo interessante, ela também possui suas limitações. Uma delas é a possível seleção clonal de parasitos nas sucessivas passagens realizadas desde a obtenção do isolado por aspirado de lesão cutânea até a infecção dos animais para iniciar o tratamento. Essas passagens em meio de cultura e *in vivo* podem favorecer a seleção de clones que não correspondem à população de parasitos que originalmente infectava o hospedeiro. Além disso, essa seleção também pode ter ocorrido para a cepa M2903 que, há mais de três anos, vem sendo mantida por repasses sucessivos em hamsters dourados, no Laboratório de Pesquisas Clínicas. A seleção de clones melhores adaptados a esse hospedeiro limita a comparação dos isolados com a cepa referência. Dessa forma, ainda são necessários ajustes nos modelos de avaliação de sensibilidade que permitam acessar de maneira mais fidedigna o nível de sensibilidade a fármacos em *Leishmanias* sp.

Em comparação à resposta apresentada pela cepa referência M2903, podemos considerar os isolados bastante sensíveis ao tratamento com o antimoniato de meglumina, uma vez que essa cepa já é considerada uma cepa sensível a esse fármaco

(Yardley *et al.*, 2006). Esses dados nos levam a pensar que alternativas terapêuticas que utilizassem baixas doses de antimônio nos pacientes da região metropolitana de Belo Horizonte poderiam ser viáveis, devido à alta sensibilidade *in vivo* dos isolados circulantes nessa região e também às experiências no tratamento de portadores de LC com baixas doses de antimonial pentavalente relatadas com sucesso na região metropolitana do Rio de Janeiro, RJ, Brasil (Oliveira-Neto *et al.*, 1997; Oliveira-Neto *et al.* 2006). Entretanto, essa extrapolação deve ser feita com grande cautela. Ainda há uma enorme lacuna entre os modelos experimentais e a real situação em humanos. Modelos *in vitro* são incompletos pela falta do contexto imunológico. Por outro lado, a resposta imunológica pode ser diferente entre animais e humanos. Além disso, devido aos efeitos imuno-moduladores exercidos por substâncias da saliva dos flebotomíneos, há uma grande diferença entre uma infecção causada experimentalmente e aquela adquirida pela picada do inseto. Portanto, mais trabalhos são necessários para se estudar os modelos *in vivo* a fim de reunirmos informações que subsidiem a extrapolação dos dados para o tratamento em humanos.

Terapêuticas alternativas, como uso de formulações tópicas e a combinação de drogas para o tratamento da LTA, têm sido investigados na tentativa de se obter um tratamento que seja menos tóxico e de melhor adesão para os pacientes. Diante dos resultados observados *in vivo*, na primeira parte deste trabalho, prosseguimos com a avaliação da eficácia da associação de uma baixa dose de antimônio com a aplicação de uma formulação hidrofílica de paromomicina em hamsters experimentalmente infectados com três isolados utilizados na primeira parte deste trabalho e com a cepa M2903.

A avaliação da eficácia da associação $Sb^V + PA$ sobre os isolados foi prejudicada pela concentração de antimônio escolhida. A dose de 25 mg $Sb^V/Kg/dia$, por 20 dias, foi suficiente para promover a completa cicatrização das lesões dos animais infectados. O mesmo resultado foi observado para os animais tratados com a combinação 25 mg $Sb^V/Kg/dia$ e paromomicina-gel e não foi observada diferença para o tempo de cura entre esses grupos. Esse achado revelou que a sensibilidade desses três isolados é maior do que aquela verificada na primeira parte deste trabalho, em que a dose de 50mg $Sb^V/Kg/dia$, por 20 dias, já havia sido eficaz para cicatrização das lesões nos animais infectados por eles. Entretanto, apesar da eficácia clínica nos animais, essa dose não apresentou o mesmo desempenho sobre o parasitismo. A dose de 25 mg $Sb^V/Kg/dia$, por

20 dias, reduziu significativamente o parasitismo no baço dos animais infectados com os isolados; no sítio da lesão, porém, ela não reduziu a carga parasitária de dois dos três isolados. Destes dois, apenas um isolado (LPC05) mostrou redução significativa da carga parasitária no sítio da lesão quando tratado com a associação $Sb^V + PA$. Já para os animais infectados com a cepa M2903 e tratados com a associação 25 mg $Sb^V + PA$ Gel, observou-se eficácia clínica da combinação em detrimento dos tratamentos monoterápicos, uma vez que apenas ela reduziu significativamente os tamanhos de lesão dos animais quando comparados aos dos animais do grupo controle. Com relação à carga parasitária, houve redução significativa no baço dos animais tratados com a dose única de antimônio e com sua associação à PA-gel. Na lesão, o mesmo não foi verificado. Nenhum dos animais infectados com os isolados ou com a cepa M2903 e tratados somente com a paromomicina-gel apresentou cura clínica, apesar de o tratamento isolado com a PA-Gel ter mostrado desempenho significativamente melhor, em termos de redução do tamanho médio da lesão, quando comparado ao grupo controle, ao final do experimento. Apenas os animais infectados com a cepa M2903 e tratados duas vezes ao dia com 100 μ L de paromomicina-gel apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) da carga parasitária na lesão quando comparados aos animais do grupo controle; no entanto essa diferença não se mostrou expressiva.

Considerando-se apenas o parâmetro clínico para o modelo utilizado, nosso trabalho evidenciou alta sensibilidade *in vivo* ao antimoniató de meglumina dos isolados de *Leishmania* spp. circulantes na região de Belo Horizonte, quando comparados à cepa de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903, e a atividade da combinação Sb^V -PA sobre a cepa M2903. É possível que a atividade da combinação Sb^V -PA também seja observada sobre os isolados com uma dose menor de antimônio. Quando acrescido o parâmetro parasitológico, porém, a eficácia de baixas doses de antimônio e sua associação com a paromomicina-gel não demonstra, aparentemente, ser interessante. Mesmo com a lesão cicatrizada, o parasitismo pós-tratamento pode permanecer alto no sítio de infecção e representar causa de recidiva. Entretanto não se sabe ao certo a importância da persistência parasitológica em pacientes curados de LC. A presença de DNA de *L. braziliensis* já foi verificada em sangue periférico e cicatrizes de pacientes, muitos anos após a cura clínica (Guevara *et al.*, 1993; Haddad *et al.*, 1996). Schubach *et al.* (1998) conseguiram isolar, em meio de cultura, parasitos viáveis (*Leishmania braziliensis*) da cicatriz de um paciente, onze anos após o tratamento e cura com Sb^V .

Esses resultados sugerem que a cura clínica da LC nem sempre está associada à cura parasitológica.

Além disso, nossos dados mostraram baixa eficácia clínica e parasitológica do tratamento tópico com paromomicina-gel isoladamente. Estes dados estão em contraste com estudos prévios que relataram eficácia do gel de PA *in vivo* sobre *L. (L.) major*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Gonçalves et al. (2005), Mussi et al. (2007) e Aguiar et al. (2009) mostraram que camundongos BALb/c infectados com promastigotas de *L. (L.) major* e tratados com paromocinina-gel 10%, duas vezes ao dia, tiveram suas lesões completamente cicatrizadas, dias após o término do tratamento. Aguiar et al. (2009), inclusive, verificou redução significativa no parasitismo no sítio de lesão desses animais.

Para *L. (L.) amazonensis*, Gonçalves et al. (2005) demonstraram alta eficácia do gel de paromomicina 10% sobre camundongos Balb/C experimentalmente infectados. A atividade do gel de PA foi maior que a observada para o antimônio parenteral. No entanto, o estudo de Aguiar et al. (2010) apresenta baixo percentual de cura (20%) nos animais tratados somente com PA tópica. Essa diferença pode ser atribuída a diferenças experimentais entre os dois estudos, uma vez que os camundongos foram infectados com promastigotas e amastigotas no estudo de Gonçalves et al. (2005) e Aguiar et al. (2010), respectivamente. A doença se mostra mais agressiva em animais infectados com amastigotas, e os resultados da terapêutica podem ser marcadamente influenciados por isso (Garnier *et al.*, 2007).

Utilizando hamsters infectados com amastigotas de *L. (V.) braziliensis*, Gonçalves et al. (2005) não verificou cicatrização de lesão, mas demonstrou eficácia semelhante entre o tratamento com paromomicina-gel, duas vezes ao dia, por 20 dias, e o tratamento parenteral com antimoniato de meglumina. No entanto, essa comparação pode estar comprometida, pois a dose utilizada nesse estudo (20mg Sb^V/Kg/dia, por 20 dias) é ineficaz para cicatrização das lesões e eliminação dos parasitos no sítio de lesão e no baço, considerando-se o modelo utilizado. Morais-Teixeira (2006) demonstrou que a dose eficaz para o tratamento de hamsters dourados infectados com amastigotas de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903 está entre 100 e 200mg/Kg/dia, por 20 dias.

Avaliando a eficácia da associação entre o antimoniato de meglumina e a paromomicina-gel, Morais-Teixeira (2010) demonstra que, *in vivo*, é possível reduzir a dose plena de Sb^V em associação à paromomicina tópica, e obter redução significativa no diâmetro das lesões dos animais infectados com a cepa M2903. Em relação à carga

parasitária, os dados revelaram redução do parasitismo no sítio de lesão na ordem de 10^2 e no baço na ordem de 10^3 , quando os animais foram tratados com 50mg Sb^V/Kg/dia associado à aplicação tópica de paramomicina-gel 10%, duas vezes ao dia, por 20 dias. Neste trabalho, observou-se redução significativa do tamanho das lesões de hamsters infectados com a cepa M2903 e tratados com 25 mg Sb^V/Kg/dia associados à aplicação tópica de paramomicina-gel 10%, duas vezes ao dia, por 20 dias. Entretanto, não houve redução expressiva do parasitismo pós-tratamento no sítio de lesão. Essa redução ocorreu apenas no baço dos animais.

Em todos os experimentos conduzidos, até o momento, com hamsters infectados com a cepa M2903 e com isolados de pacientes portadores de LC, o tratamento único com paramomicina-gel não se mostrou eficiente na redução do tamanho de lesão e do parasitismo local e sistêmico. Esse dado é conflitante com o estudo de Santos (2008), que demonstrou cura clínica em 21,4% dos pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados apenas por aplicação tópica da formulação hidrofílica de paramomicina 10%, duas vezes ao dia, por 20 dias. Quando considerado o retratamento com a paramomicina-gel, o percentual de cura subiu para 57,1% . Esses dados demonstram a lacuna existente entre os modelos experimentais e a real situação em humanos.

Nosso trabalho evidenciou alta sensibilidade ao antimoniato de meglumina *in vivo* e diferenças fenotípicas existentes entre isolados de *Leishmania* spp. provenientes de portadores de LC, bem como a possibilidade de a associação entre o antimoniato de meglumina com a aplicação tópica da paramomicina-gel ser uma alternativa interessante no tratamento da leishmaniose cutânea. As tabelas 3 e 4, a seguir, resumem o conjunto de dados gerados neste trabalho. Em suma, todos os isolados mostraram-se sensíveis às doses de 50 e 25mg Sb^V/Kg/dia, IM, por 20 dias, e a associação Sb^V + PA foi efetiva na a redução do tamanho de lesão para a cepa M2903 e na redução da carga parasitária para o isolado LPC05.

Tabela 3 – Resumo da atividade da dose 50mg de Sb^V/Kg/dia, IM, por 20 dias, sobre o tamanho de lesão e carga parasitária local e sistêmica em hamsters infectados pelos diferentes isolados de *Leishmania (V.) braziliensis* utilizados neste trabalho.

Isolados		Tamanho de Lesão (mm)		Log (carga parasitária)			
				Lesão		Baço	
		D0	D25	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Cepa Referência	M2903	9,29	10,54	3,91	4,95	4,32	1,60
Padrão Persistência	LPC01	6,02	0,00	4,06	0,00	4,67	1,57
	LPC02	3,96	0,00	4,32	0,00	3,55	0,41
	LPC03	4,52	0,00	4,36	0,00	2,86	0,00
	LPC04	9,87	0,00	1,78	0,00	1,72	0,00
	LPC05	5,28	0,00	3,82	0,00	4,75	0,00
	LPC09	5,14	0,00	4,60	1,36	6,11	0,00
	2824	5,77	0,55	2,95	0,00	4,79	0,00
	2889	12,57	0,50	1,30	0,00	4,97	1,34
Padrão Regressão	LPC06	5,58	0,00	5,33	0,26	4,83	0,00
	LPC07	8,85	0,00	2,71	0,00	2,83	0,00
	LPC08	9,99	0,00	2,17	0,49	0,00	0,00
	LPC10	3,59	0,00	4,01	0,44	4,88	0,50
	LPC11	4,92	0,00	3,00	0,00	2,92	0,00

D0 – Dia antes do início do tratamento. D25 – 5º dia após o término do tratamento.

Tabela 4 – Resumo comparativo entre a atividade da dose 25mg de Sb^V/Kg/dia, IM, por 20 dias, e a aplicação tópica de paromomicina, administradas isoladas e em associação, sobre o tamanho de lesão e carga parasitária local e sistêmica em hamsters infectados por 3 isolados de *Leishmania (V.) braziliensis* utilizados neste trabalho mais a cepa referência M2903.

Isolados	Tratamentos	Tamanho de Lesão (mm)		Log (carga parasitária)			
				Lesão		Baço	
		D0	D25	Controle	Tratado	Controle	Tratado
M2903	Sb	6,66	12,13	4,11	3,71	4,40	1,70
	Sb + PA	6,64	2,93	4,11	3,45	4,40	1,72
	PA	6,78	9,71	4,11	3,45	4,40	4,56
LPC01	Sb	5,81	0,00	4,00	3,72	6,06	0,71
	Sb + PA	5,09	0,00	4,00	3,85	6,06	0,52
	PA	5,15	4,50	4,00	4,48	6,06	5,67
LPC03	Sb	5,32	0,00	4,30	0,37	2,26	0,00
	Sb + PA	5,66	0,00	4,00	0,80	2,26	0,00
	PA	6,33	6,47	4,00	4,41	2,26	3,89
LPC05	Sb	7,23	0,00	3,55	1,94	4,90	0,00
	Sb + PA	8,63	0,00	4,00	0,20	4,90	0,00
	PA	7,18	3,93	4,00	3,99	4,90	5,29

D0 – Dia antes do início do tratamento. D25 – 5º dia após o término do tratamento.

6 CONCLUSÕES

Hamsters dourados infectados com isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* apresentaram diferenças na evolução da leishmaniose cutânea. Alguns isolados apresentaram desenvolvimento da doença semelhante à cepa referência de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903, com persistência da lesão, enquanto outros apresentaram padrão caracterizado por não persistência.

Todos os isolados apresentaram-se sensíveis ao tratamento com a dose de 50mg Sb^V/Kg/dia, por 20 dias, e três isolados mostraram-se sensíveis à dose de 25mg Sb^V/Kg/dia, por 20 dias. Em comparação com a sensibilidade da cepa M2903, os isolados de *Leishmania braziliensis* mostraram-se muito mais sensíveis ao antimoniato de meglumina.

A avaliação da atividade da combinação antimoniato de meglumina + paramomicina-gel sobre os isolados foi prejudicada pela dose de Sb^V utilizada. No entanto, os dados do nosso trabalho sugerem que essa combinação pode ser eficaz com uma dose menor de Sb^V. Para a cepa M2903, a combinação Sb^V + PA Gel mostrou-se eficaz na redução do tamanho de lesão.

Os isolados apresentaram-se mais sensíveis ao tratamento com paramomicina-gel do que a cepa M2903. Entretanto, não foi verificada eficácia expressiva da aplicação tópica de paramomicina, isoladamente, em hamsters experimentalmente infectados com os isolados e com a cepa M2903.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdo M, Elamin W, Khalil E, Mukhtar M. Antimony-resistant *Leishmania donovani* in eastern Sudan: incidence and in vitro correlation. *East Mediterr Health J.* 2003 Jul; 9(4):837-43.

Adhikari S, Maskay N. The economic burden of Kala-azar in households of the Danusha and Mahottari districts of Nepal. *Acta Trop.* 2003 Sep;88(1):1-2.

Aguiar M, Pereira A, Fernandes AP, Ferreira L. 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.* 2010 Nov;54(11):4699-704.

Aguiar M, Silva D, Nunan F, Nunan E, Fernandes A., Ferreira L. 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.* 2009 Dec;64(6):1234-40.

Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Apr;10(2):298-319.

Arana B, Mendoza C, Rizzo N, Kroeger A. Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Nov;65(5):466-70.

Arana B, Rizzo N, Diaz A. Chemotherapy of cutaneous leishmaniasis: a review. *Med Microbiol Immunol.* 2001 Nov;190(1-2):93-5.

Asilian A, Jalayer T, Whitworth J, Ghasemi R, Nilforooshzadeh M, Olliaro P. 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.* 1995 Dec;53(6):648-51.

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

Bailey M, Lockwood D. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 2007 Mar-Apr;25(2):203-11.

Balanco J, Pral E, da Silva S, Bijovsky A, Mortara R, Alfieri S. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. *Parasitology.* 1998 Feb;116 (Pt 2):103-13.

Ben Salah A, Zakraoui H, Zaatour A, Ftaiti A, Zaafour B, Garraoui A, et al. A randomized, placebo-controlled trial in Tunisia treating cutaneous leishmaniasis with paromomycin ointment. *Am J Trop Med Hyg.* 1995 Aug;53(2):162-6.

Berman J. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2003 Oct;16(5):397-401.

Berman J, Chulay J, Hendricks L, Oster C. Susceptibility of clinically sensitive and resistant *Leishmania* to pentavalent antimony in vitro. *Am J Trop Med Hyg.* 1982 May;31(3 Pt 1):459-65.

Berman J, Gallalle J, Best J. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem Pharmacol.* 1987 Jan 15;36(2):197-201.

Berman J, Waddell D, Hanson B. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985 Jun;27(6):916-20.

Bermúdez H, Rojas E, Garcia L, Desjeux P, Dujardin JC, Boelaert M, et al. Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine. *Ann Trop Med Parasitol* 100:591-600, 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª edição. Brasília, Editora do Ministério da Saúde, 2007.

Carvalho E, Correia-Filho D, Bacellar O, Almeida R, Lessa H, Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1995 Sep;53(3):273-7.

Costa D, Carregaro V, Lima-Júnior D, Silva N, Milanezi C, Cardoso C, et al. BALB/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of *Leishmania braziliensis* present severe lesions due to IL-4 production. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Mar 1;5(3):e965.

Croft S, Sundar S, Fairlamb A. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan;19(1):111-26.

Cupolillo E, Grimaldi GJ, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Mar;50(3):296-311.

DeKrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun.* 1998 Feb;66(2):827-9.

El-On J, Hamburger A. Topical treatment of New and Old World cutaneous leishmaniasis in experimental animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(5):734-7.

El-On J, Jacobs G, Witztum E, Greenblatt C. Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals. *Antimicrob Agents Chemother*. 1984 Nov;26(5):745-51.

Gamboa D, Torres K, De Doncker S, Zimic M, Arevalo J, Dujardin J. Evaluation of an in vitro and in vivo model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology*. 2008 Mar;135(3):319-26.

Garnier T, Mäntylä A, Järvinen T, Lawrence J, Brown M, Croft S. In vivo studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Oct;60(4):802-10.

Giudice A, Camada I, Leopoldo P, Pereira J, Riley R, Wilson M, et al. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis*. 2007 Feb 22;7:7.

Gonçalves G, Fernandes A, Souza R, Cardoso J, de Oliveira-Silva, F, Maciel F, et al. Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Trop*. 2005 Feb;93(2):161-7.

Guevara P, Ramirez JL, Rojas E, Scorza JV, Gonzalez N, Anez N. *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure. *Lancet*. 1993; 341:1341.

Gumy A, Louis J, Launois P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Int J Parasitol*. 2004 Mar 29;34(4):433-44.

Haddad F, Schubach A, Oliveira-Neto MP, Degraive W, Pirmez C, Fernandes O. Detection of minicircle DNA of *Leishmania* in paraffin-embedded tissue from scars of treated patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996; 85:581-582.

Hadighi R, Mohebbali M, Boucher P, Hajjarian H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med.* 2006 May;3(5):e162.

Indiani de Oliveira C, Teixeira M, Teixeira C, Ramos de Jesus J, Bomura Rosato A, Santa da Silva J, et al. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes Infect.* 2004 Sep;6(11):977-84 .

Kahl L, Byram J, David J. *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Tres Bracos, Bahia, Brazil differ in virulence for the golden hamster. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990 Nov-Dec;84(6):783-4.

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

Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, Ramirez L, et al. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis.* 2008 Jan 15;46(2):223-31.

Luz Z, Silva A, de Oliveira-Silva F, Caligiorne L, Rabello A. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Feb;104(1):62-6.

Marsden P, Netto E, Badaró R, Cuba C, Costa J, Barreto A. Apparent cure of a difficult treatment problem in a patient with mucosal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1986 Mar;35(2):449.

Mattos M. Determinação de parâmetros clínicos e prognósticos para o controle de cura da leishmaniose tegumentar americana. [Tese]. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2004.

Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol*. 2010 Aug;63(2):309-22.

Morais-Teixeira. Avaliação da atividade de fármacos, isolados e em associação, sobre leishmanias de importância médica no Brasil [Tese]. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, 2009.

Morais-Teixeira E, Lima BSS, Gonzaga FM, Gomes LI, Aguiar MG, Ferreira LA, et al. Combinação de paromomicina tópica e antimoniato de meglumina (Glucantime) intramuscular no tratamento de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados experimentalmente com *Leishmania (Viannia) braziliensis*. In: 22ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e 10ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses. 2010 Outubro. Uberaba, MG, Brasil.

Neal R, Allen S, McCoy N, Olliaro P, Croft S. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. *J Antimicrob Chemother*. 1995 May;35(5):577-84.

Neal R, Murphy A, Olliaro P, Croft S. Aminosidine ointments for the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994 Mar-Apr;88(2):223-5.

Oliveira-Silva F, Teixeira EM, Rabello A. Efeito dose-resposta do antimoniato de meglumina em infecção experimental com *Leishmania (Viannia) braziliensis*. In: 26ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e 14ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses. 2010 Outubro. Uberaba, MG, Brasil.

Oliveira-Silva F, Santos GA Rabello A. Avaliação da sensibilidade in vitro de *Leishmania* spp. isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea. In: 24ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e 12ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses. 2010 Outubro. Uberaba, MG, Brasil

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

Passos V, Fernandes O, Lacerda P, Volpini A, Gontijo C, Degraive W, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Trop.* 1999 Apr 30;72(3):251-8.

Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin R. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest.* 1993 Apr;91(4):1390-5.

Remme J, Blas E, Chitsulo L, Desjeux P, Engers H, Kanyok T, et al. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. *Trends Parasitol.* 2002 Oct;18(10):421-6.

Rey J, Travi B, Valencia A, Saraiva N. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex in vivo and in vitro. *Am J Trop Med Hyg.* 1990 Dec;43(6):623-31.

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

Robledo S, Valencia A, Saravia N. Sensitivity to Glucantime of *Leishmania viannia* isolated from patients prior to treatment. *J Parasitol.* 1999 Apr;85(2):360-6.

Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona M, Ouellette M, Saravia N. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J Infect Dis.* 2006 May 15;193(10):1375-83.

Romero G, Guerra M, Paes M, Macêdo V. 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.* 2001 Nov;65(5):456-65.

Rotondo A. Aspectos clínicos e evolutivos da casuística de leishmaniose cutânea do centro de referência em Leishmaniose do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ), Belo Horizonte, 2001-2005 [Dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, 2007.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2002 Nov;2(11):845-58.

Glucantime[®] [bula]. Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. Suzano, São Paulo, Brasil. 2010.

Santos A, Noronha E, Ferreira L, Carranza-Tamayo C, Cupolillo E, Romero G. Effect of a hydrophilic formulation of topical paromomycin on cutaneous leishmaniasis among patients with contraindications for treatment with pentavalent antimonials. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008 Sep-Oct;41(5):444-8.

Santos J, Lauand L, Souza G, Macêdo V. Socioeconomic factors and attitudes towards household prevention of American cutaneous leishmaniasis in an endemic area in Southern Bahia, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2000 Jul-Sep;16(3):701-8.

Schriefer A, Wilson M, Carvalho E. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2008 Oct;21(5):483-8.

Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira AL et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Jun;58(6):824-7.

Sereno D, Holzmüller P, Mangot I, Cuny G, Ouaiissi A, Lemesre J. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Jul;45(7):2064-9.

Sinagra A, Riarte A, Luna C, Campanini A, Segura E. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*: biological behavior in golden hamsters of isolates from Argentine patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1997 Jul;57(1):115-8.

Soto J, Fuya P, Herrera R, Berman J. Topical paromomycin/methylbenzethonium chloride plus parenteral meglumine antimonate as treatment for American cutaneous leishmaniasis: controlled study. *Clin Infect Dis.* 1998 Jan;26(1):56-8.

Soto J, Hernandez N, Meija H, Grogl M, Berman J. Successful treatment of New World cutaneous leishmaniasis with a combination of topical paromomycin/methylbenzethonium chloride and injectable meglumine antimonate. *Clin Infect Dis.* 1995 Jan;20(1):47-51.

Stauber L. Characterization of strains of *Leishmania donovani*. *Exp Parasitol.* 1966 Feb;18(1):1-11.

Sudhandiran G, Shaha C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Biol Chem.* 2003 Jul 4;278(27):25120-32.

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

Sundar S, Jha T, Thakur C, Sinha P, Bhattacharya S. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med.* 2007 Jun 21;356(25):2571-81.

Thakur C. Socio-economics of visceral leishmaniasis in Bihar (India). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000 Mar-Apr;94(2):156-7.

Tuon F, Amato V, Graf M, Siqueira A, Nicodemo A, Amato Neto V. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis. *Int J Dermatol.* 2008 Feb;47(2):109-24.

Wilson H, Dieckmann B, Childs G. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*: experimental cutaneous infections in golden hamsters. *Exp Parasitol.* 1979 Apr;47(2):270-83.

World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010.

World Health Organization. Leishmaniasis: Burden of Disease. WHO, 2012. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> Acesso: 19 Jan 2012.

Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Doncker S, Ramirez L, et al. American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *J Infect Dis.* 2006 Oct 15;194(8):1168-75.

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