



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE**



**Avaliação do papel do polimorfismo de cepas de
Leishmania (V.) braziliensis sobre a refratariedade ao
tratamento com antimonial pentavalente**

Silvana Conceição da Silva

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,
SIBI - UFBA.

C871 Da Silva, Silvana Conceição

Avaliação do papel do polimorfismo de cepas de *Leishmania (V.) braziliensis* sobre a refratariedade ao tratamento com antimonial pentavalente/ Silvana Conceição da Silva. - Salvador, 2013.

90 f.

Orientador: Prof^o. Dr^o Nicolaus Albert Borges Schriefer.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia, 2013.

1. *Leishmania (V.) braziliensis*. 2. Resistência. 3. Refratariedade. 4. Antimonial. I. Schriefer, Nicolaus Albert Borges. II Universidade Federal da Bahia. III. Avaliação do papel do polimorfismo de cepas de *Leishmania (V.) braziliensis* sobre a refratariedade ao tratamento com antimonial pentavalente.

CDU:616-083:173.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE



**Avaliação do papel do polimorfismo de cepas de
Leishmania (V.) braziliensis sobre a refratariedade ao
tratamento com antimonial pentavalente**

Silvana Conceição da Silva

Professor-orientador: Albert Schriefer

Dissertação apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, da área de concentração em Parasitologia Molecular.

Salvador (Bahia), 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- Paulo Roberto Lima Machado (Presidente) – Doutor em Medicina – UFBA, pesquisador do Serviço de Imunologia do Hospital das Clínicas- UFBA.

- Marcelo Távora Mira – Doutor em Bioquímica – PUCPR, Pesquisador da PUCPR.

Membro Suplente:

- Nicolaus Albert Schriefer (Orientadora) – Doutor em Imunologia – UFBA, pesquisador do Serviço de Imunologia do Hospital das Clínicas – UFBA, professor titular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) e de Imunologia (PPGIIm), UFBA.

FONTES DE FINANCIAMENTO

1. Tropical Medicine Research Center (TMRC)
2. Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia de Doenças Tropicais (INCT-DT)
3. Bolsa de Estudo da CNPq
4. NIH - National Institute of Health (Grant P50AI30639-16 e R03AI067663-02)

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, minha fortaleza, por ter me abençoado e iluminado, a minha exímia mãe Raimunda Maria C. da Silva por ter sonhado e colaborado na concretização desta vitória.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Albert Schriefer, pela oportunidade, confiança e pelos inestimáveis ensinamentos, um exemplo de pesquisador.

A Dr^o Edgar Marcelino por ter me aceito no Serviço de Imunologia.

A minha amiga Marcia Barbosa pelo incentivo no mestrado e companheirismo.

A Angela Giudice pelos conhecimentos, paciência e dedicação nas técnicas desempenhadas.

Juliana Almeida e Viviane Magalhães pela amizade, conhecimentos adquiridos e momentos difíceis compartilhados.

A equipe de Corte de Pedra, pela disponibilidade e contribuição.

Anselmo, pelo auxílio nas análises estatísticas e amizade.

Ao Serviço de Imunologia, Lilian, Rosana, Thaís, Adriano, Kátia Salgado e Luis Henrique pelos bons momentos e auxílio na concretização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde pelo aprendizado.

Aos colegas de trabalho Juliana Pedra, Jeane Lima, Renata Damasceno, Diana Pio e Adnólia Correia.

Aos meus familiares pela paciência, carinho, apoio e por torcerem pelo meu sucesso.

Ao CNPq fonte financiadora.

Enfim, obrigada a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente de uma forma especial na realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Pág.
Índice de Abreviaturas	09
Índice de Tabelas	11
Índice de Figuras	12
I- Resumo	13
II- Objetivos	15
II.1. Geral	15
II.2. Específico	15
III- Introdução	16
IV- Revisão da Literatura	19
IV.1. Histórico da Doença	19
IV.2. Classificação Taxonômica	21
IV.3. Epidemiologia da Leishmaniose	22
IV.4. Ciclo Evolutivo da <i>Leishmania sp.</i>	24
IV.4.1. Ciclo no Vetor	25
IV.4.2. Ciclo no Hospedeiro	25
IV.5. Leishmaniose Tegumentar Americana	26
IV.6. Tratamento	29
IV.7. Epidemiologia Molecular	35
V- Hipótese	39
VI- Justificativa	40
VII- Materiais e Métodos	41
VIII- Resultados	56
IX- Discussão	64
X- Conclusão	72
XI- Referências	73
Anexos	83

LISTA DE ABREVIATURAS

AGP	Guanosina trifosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CP	Corte de Pedra
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CHR	Cromossomo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTPs	Desoxirribonucléicos
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GM-CSF	Fator de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFN	Interferon
IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
LB	Meio de cultura líquido Luria-Bertani
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LD	Leishmaniose disseminada
LM	Leishmaniose mucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LVA	Leishmaniose visceral americana
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MTT	3-4,5- dimetiltiazol-2-il -2,5difenil bromo tetrazolium

NAOH	Hidróxido de sódio
NNN	Meio de cultura Nicolle, Novy e McNeal
Sb ⁺⁵	Antimonial pentavalente
Sb ⁺³	Antimonial trivalente
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo individual
TBE	Tris borato EDTA
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Comparação das respostas ao Glucantime ®, <i>in vitro</i> , de promastigotas de <i>L.(V.) braziliensis</i> isoladas de casos de LTA responsivos e refratários ao antimonial acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra - Ba entre 2008 e 2011.	58
Tabela 2. Comparação das respostas ao Glucantime, <i>in vitro</i> , de promastigotas de <i>L.(V.) braziliensis</i> isoladas de casos de LC e LD acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra – Ba entre 2008 e 2011.	58
Tabela 3. Comparação das respostas ao Glucantime, <i>in vitro</i> , de promastigotas <i>L.(V.) braziliensis</i> isoladas de casos de LC e LM acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra – Ba entre 2008 e 2011.	59
Tabela 4. SNPs/Indels encontrados no <i>locus</i> CHR 24/3074 de <i>L. (V.) braziliensis</i> em Corte de Pedra e a frequência de seus alelos na amostra.	62
Tabela 5. Haplótipos de SNPs/ Indels no <i>locus</i> CHR 24/3074 encontrados em pelo menos 10% dos isolados de <i>L. (V.) braziliensis</i> de Corte de Pedra, estudados.	63
Tabela 6. Associação entre SNPs/Indels de <i>L.(V.) braziliensis</i> no <i>locus</i> CHR 24/3074.	63

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Foto por satélite da distribuição dos casos de LTA refratários e 60
responsivos ao tratamento com antimonial em Corte de Pedra.

I. RESUMO

Introdução: A primeira linha de tratamento da leishmaniose tegumentar americana (LTA) é baseada nos derivados do antimônio. A refratariedade ao antimônio é frequente entre os pacientes com LTA. *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal causa de LTA no Brasil. A *L. (V.) braziliensis* causa três formas de leishmaniose na Bahia: leishmaniose cutânea localizada (LC), a mais comum com pequenas lesões auto curáveis até as formas mais grave e de difícil tratamento, a leishmaniose mucosa (LM), e a leishmaniose disseminada (LD). **Métodos e Resultados:** Neste estudo, foram incluídos 91 casos de LTA (67 LC, 7 LM e 17 LD) de uma região endêmica para *L. (V.) braziliensis*, chamada Corte de Pedra (CP), no estado da Bahia/Brasil, e os quais apresentaram culturas de parasitos positivas. Foram avaliados: (1) associação entre o genótipo de *L.(V) braziliensis* e a resposta dos pacientes ao antimonio de meglumina (Glucantime®); (2) a distribuição geográfica dos pacientes refratários ao glucantime dentro da região afetada; e (3) a resistência da *L. (V.) braziliensis* ao Glucantime® *in vitro*. Os parasitos foram genotipados com base no sequenciamento de um único locus polimórfico (que começa na posição 3074 do cromossomo 24) desta população de *L. (V.) braziliensis*. Para a avaliação da distribuição geográfica dos casos responsivos e refratários, as coordenadas geográficas dos locais de moradia dos pacientes foram adquiridas por GPS e comparados usando o teste de Cusick and Edwards. As coordenadas dos locais de moradia dos pacientes foram plotadas em uma foto de satélite da região para inspeção visual, usando o sistema de informação geográfica (SIG). Foi encontrado que a refratariedade é amplamente distribuída na região, quase que uniformemente, contudo não foi possível detectar associações entre os genótipos dos parasitos e a resposta ao tratamento. A sensibilidade ao antimônio foi avaliada expondo as formas promastigotas da *L.(V) braziliensis* a concentrações crescentes do antimonio de meglumina (Glucantime®) *in vitro*. Os parasitos de pacientes com LM e LD foram significativamente mais resistentes ao antimônio do que aqueles isolados dos casos de LC. Assim, a resistência ao antimônio observada *in vitro* está de acordo com o que tem sido observado em campo, onde os pacientes com LM e LD tendem a ter uma resposta menor ao tratamento com Glucantime® do que os indivíduos com LC. Embora não tenha sido encontrada associação entre as cepas parasitárias e a resposta ao tratamento nestes pacientes com LTA, na genotipagem dos isolados foi usado um único locus, o qual certamente limitou o poder discriminatório da técnica. **Conclusão:** Nos estudos futuros, estas associações devem ser repetidas aplicando mais loci polimórficos na genotipagem dos isolados de *L. (V.) braziliensis* de Corte de Pedra.

Palavras chave: *L.(V.) braziliensis*, resistência, refratariedade, antimônio

ABSTRACT

Introduction: The first line treatment of American tegumentary leishmaniasis (ATL) is based on antimony derivatives. Refractoriness to antimony is frequent among ATL patients. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the major cause of ATL in Brazil. *L. (V.) braziliensis* causes three forms of leishmaniasis in Bahia: localized cutaneous (CL), the most common with few cutaneous lesions self-cure to the more severe and difficult to treat mucosal (ML) and disseminated leishmaniasis (DL). **Methods and Results:** In the current study we enrolled 91 cases of ATL (67 CL, 7 ML, 17 DL) from the region endemic for *L. (V.) braziliensis* named Corte de Pedra (CP), in the state of Bahia/Brazil, which rendered positive parasite cultures. We evaluated: (1) association between the *L.(V) braziliensis* genotypes and patients response to meglumine antimoniate (Glucantime®); (2) geographic distribution of Glucantime refractoriness within the affected region; and (3) resistance of *L. (V.) braziliensis* to Glucantime® *in vitro*. The parasites were genotyped by sequencing of a single *locus* found to be polymorphic (starting in position 3074 of chromosome 24) for that population of *L. (V.) braziliensis*. For evaluation of geographic distribution of responsive and refractory cases, the geographic coordinates of patient's living sites were acquired by GPS and compared by the Cusick and Edwards test. The coordinates of the patient's living sites were also plotted onto a satellite photograph of the region for visual inspection, using a geographic information system. We found that refractoriness is wide spread in the region, almost evenly, but could not detect association between parasite genotype and response to treatment. Sensitivity to antimony was evaluated exposing *L.(V) braziliensis* promastigotes to increasing concentrations of meglumine antimoniate (Glucantime®) *in vitro*. Parasites from ML and DL patients were significantly more resistant to antimony than those isolated from CL cases. Thus *in vitro* resistance to antimony paralleled what is commonly observed in the field, where ML and DL patients tend to respond more poorly to Glucantime® than CL individuals. Although we did not find associations between parasite strain and treatment response in these ATL patients, we used a single *locus* in the genotyping, which certainly limited our discrimination ability. **Conclusion:** Future studies should retest this association employing more *loci* polymorphic among the *L. (V.) braziliensis* of Corte de Pedra.

Palavras chave: *L.(V.) braziliensis*, resistance, refractoriness, antimony.

II. OBJETIVOS

- **Geral:**

Avaliar se existe associação entre os genótipos e os isolados da *L.(V.) braziliensis* provenientes de formas distintas de LTA e as respostas ao tratamento *in vivo* (respostas dos pacientes) e *in vitro*.

- **Específicos:**

1. Avaliar a associação entre genótipo de *L.(V.) braziliensis* e resposta terapêutica dos casos de Leishmaniose tegumentar americana;
2. Avaliar a susceptibilidade *in vitro* ao Sb^v das promastigotas de *L.(V.) braziliensis* isolados de casos de LTA de Corte de Pedra;
3. Avaliar as distribuições geográficas dos isolados de *L.(V.) braziliensis* empregados no primeiro objetivo na área endêmica de CP e determinar o padrão espacial de respostas ao tratamento em Corte de Pedra.

III. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que apresentam em seu ciclo evolutivo a forma promastigota no inseto e amastigota no hospedeiro vertebrado (Grimaldi Junior & Tesh, 1993). A doença é transmitida pela picada do flebotomíneo infectado, acomete as células do sistema fagocítico mononuclear e órgãos internos, podendo cursar com formas tegumentares e viscerais (Desjeux, 1996).

A leishmaniose é uma doença endêmica com larga distribuição, sendo considerada uma das seis principais doenças infecciosas a nível mundial (MS, 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas em 88 países correm o risco de contrair a doença, com incidência anual de 2 milhões e prevalência de 12 milhões casos (MS, 2007).

No Brasil, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) constitui um problema de saúde pública com uma ampla distribuição geográfica, sendo as principais espécies de *Leishmania* causadoras da LTA: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A LTA estudada pela *L.(V.) braziliensis* se apresenta sobre diversas formas clínicas, que vão desde a forma cutânea com pequenas lesões auto curáveis até as formas mais graves, mucosa e disseminada. A espécie é bastante prevalente no estado da Bahia, ocorrendo, sobretudo em áreas de atividade agrícola com desmatamento. A doença afeta pessoas de todas as idades e sexos, frequentemente atingindo indivíduos produtivos (MS, 2007).

A *L.(V.) braziliensis* é o agente causal da LTA na área endêmica de Corte de Pedra (CP), região sudeste da Bahia, onde encontramos as formas cutânea, mucosa e disseminada da leishmaniose. Nos últimos anos, têm-se observado um número elevado de casos LTA em Corte de Pedra. Na década de 80, foram diagnosticados uma média de 200 casos anuais de LTA no Posto de Saúde de Corte de Pedra; já em 2009, mais de mil novos casos foram diagnosticados naquela unidade de saúde (Jirmanus *et al*, 2012). Nesta região, a incidência da leishmaniose disseminada aumentou mais de dez vezes nos últimos 20 anos (Guimarães *et al*, 2009). O tratamento para esta doença é à base de sais de antimoniato pentavalente, na dosagem de 15 a 20mg Sb^v/Kg/dia nas formas cutâneas por um período de 20 dias consecutivos, podendo-se prolongar o ciclo para 30 dias após três meses do termino do primeiro ciclo. Na forma mucosa e disseminada recomenda-se 20mg Sb^v/Kg/dia durante 30 dias consecutivos podendo repetir o ciclo após três meses. Em caso de falha após este período recomenda-se o uso de uma droga de segunda linha, a anfotericina B. O critério de cura, ou seja, de resposta satisfatória ao tratamento consiste na cicatrização completa das lesões, com epitelização e sem presença de processos inflamatórios. Caracteriza-se como falha terapêutica, a não cicatrização das lesões com aumento do processo inflamatório ao redor da lesão inicial ou recidiva das lesões após o termino do tratamento (Rodrigues *et al*, 2006; Rojas *et al*, 2006; Llanos-Cuentas *et al*, 2008).

Na leishmaniose, diversos fatores podem influenciar o desfecho terapêutico, tais como: a genética e resposta imune do hospedeiro, a resistência natural do parasito à droga e a forma clínica da doença (Hadighi *et al*, 2006; Azeredo-Coutinho *et al* 2007). Tem sido descrito que a refratariedade da leishmaniose aos antimoniais tem se elevado

em várias regiões do planeta (Lira *et al*, 1999; Sundar *et al* 2000; Hadighi *et al*, 2006; Arevalo *et al* 2007; Llanos-Cuentas *et al*, 2008;) e que a *L.(V.) braziliensis* apresenta um elevado polimorfismo genético e fenotípico (Saravia *et al*, 1998; Cupolillo *et al* 2003; Schriefer *et al* 2004). Na região de Corte de Pedra, área onde o presente estudo foi realizado, a população de *L.(V.) braziliensis* é multiclonal e diferentes cepas parasitárias têm se mostrado associadas a quadros clínicos específicos de LTA (Schriefer *et al* 2004; Queiroz *et al*, 2012). Com base nesses achados, nossa hipótese é que o polimorfismo parasitário também pode influenciar os desfechos terapêuticos na LTA causada pela *L.(V.) braziliensis*. Estudos anteriores vêm salientando que o sucesso e a falha terapêutica variam entre espécies e entre cepas distintas de uma mesma espécie de leishmania (Arevalo *et al* 2007; Llanos-Cuentas *et al*, 2008). A identificação de cepas de *L.(V.) braziliensis* associadas à falha terapêutica com antimoniais abrirá a oportunidade para a identificação de biomarcadores parasitários que possam ser empregados no melhor manejo terapêutico da LTA. Esses biomarcadores se baseariam em sequências do genoma parasitário, presentes predominantemente nas cepas encontradas em pacientes refratários ao tratamento.

IV. REVISÃO DA LITERATURA

IV.1 Histórico da Doença

As leishmanioses são doenças provocadas por protozoário flagelado do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae*. Esses protozoários têm ampla distribuição geográfica, parasitam mamíferos e outros vertebrados, e têm como hospedeiros invertebrados insetos hematófagos denominados flebotomíneos. Os flebotomíneos são vetores da ordem díptera, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*. No Velho Mundo, o gênero encontrado é o *Phlebotomus* enquanto que nas Américas, diversas espécies do gênero *Lutzomyia* transmitem *Leishmania sp.* A depender da região, estes insetos são conhecidos como tatuquira, birigui, mosquito palha, dentre outros (Pearson & Sousa, 1995; Desjeux, 1996). Os parasitas causadores da leishmaniose apresentam a seguinte posição sistemática (Levine *et al*, 1980):

Reino: Protista, Haeckel (1866).

Sub- reino: Protozoa, Goldfuss (1817)

Filo: Sarcomastigophora, Honigberg e Balamuth (1963)

Sub-filo: Mastigophora, Desing (1866)

Classe: Zoomastigophorea, Calkings (1909)

Ordem: Kinetoplastida, Honigberg (1963) emend. Vickerman (1976)

Sub-ordem: Trypanosomatida, Kent (1880)

Família: Trypanosomatidae, Doflein (1901) emend. Grobben (1905)

Gênero: *Leishmania*, Ross (1903).

No Velho Mundo, a leishmaniose foi chamada pelos viajantes como botão- do- oriente devido às características das lesões. No Novo Mundo, as primeiras observações clínicas foram feitas por Oviedo em 1535 e Pizarro em 1571, que descreveram a doença com presença de lesões desfigurantes na mucosa oral e nasal nos vales quentes e úmidos da encosta da Cordilheira dos Andes, onde cultivavam a coca. Em 1764, no Peru, Bueno descobriu o inseto transmissor da doença. Cunningham em 1885 fez a primeira observação dos parasitos do gênero *Leishmania* dos casos de leishmaniose visceral na Índia. Ross e Wright em 1903 identificaram e relataram o parasito, denominando-o de *Leishmania donovani* ao parasito causador do calazar e ao parasito encontrado no botão- do- oriente de *Leishmania tropica*. Nicolle em 1908 denominou de *Leishmania infantum* o parasito do calazar do Mediterrâneo. Este pesquisador foi o primeiro a cultivar parasito no meio de cultura Nicolle, Novy e McNeal (NNN) (Medeiros & Roselino, 1999; Rath *et al*, 2003; MS, 2007).

No Brasil, em 1855, a leishmaniose foi descrita por Cerqueira que chama atenção à presença de lesões com características similares ao do botão- do- oriente. Em 1908, devido à construção de estradas de Ferro em São Paulo, a doença passou a ser conhecida como úlcera- de- Bauru. Em 1911 Gaspar Vianna cunhou o parasito causador dessa doença no Brasil como *Leishmania braziliensis*, devido às diferenças morfológicas existentes entre a *Leishmania tropica* causadora do botão- do- oriente, e o agente etiológico da leishmaniose cutânea brasileira. Este cientista introduziu o tártaro

emético na terapêutica da leishmaniose tegumentar em 1912. Aragão foi o primeiro cientista a evidenciar o papel do flebotomíneo na transmissão da doença em 1922. Em 1926, Montenegro introduziu a intradermoreação no diagnóstico imunológico, sendo utilizada até os dias atuais (Medeiros & Roselino, 1999; MS, 2007).

IV.2 Classificação Taxonômica

A classificação taxonômica do gênero *Leishmania* é difícil devido a fatores como ampla distribuição geográfica e a diversidade de espécies. Primeiramente, a avaliação taxonômica se baseou em características clínicas, sendo então refinada com aplicação de critérios baseados em aspectos epidemiológicos, biológicos, bioquímicos e moleculares do parasito (Grimaldi & Tesh, 1993; Atlas, 2006).

No Velho Mundo, a leishmaniose cutânea é causada principalmente pelas espécies *Leishmania major* e *L. tropica*, e no Novo Mundo pelos complexos de espécies *L. mexicana* e *L. braziliensis* (Pearson & Sousa, 1995; Pinheiro, 2004).

Existem oito espécies de leishmanias pertencentes ao subgênero *Viannia* (V.) e *Leishmania* (L.), que são responsáveis pela doença no ser humano no Novo Mundo:

- *Leishmania* (V.) *braziliensis* (**Vianna, 1911**) causa lesões cutâneas e mucosas, e apresenta distribuição geográfica estendendo-se da América Central ao Norte da Argentina.
- *Leishmania* (V.) *guyanensis* (**Floch, 1954**): causa predominantemente lesões cutâneas e ocorre na Calha Norte da Bacia Amazônica, Guianas e países do noroeste Sul americano;

- *Leishmania (V.) panamensis* (**Lainson & Shaw, 1972**) causa predominantemente lesões cutâneas, e ocorre na América Central e Costa Pacífica da América do Sul;
- *Leishmania (V.) lainsoni* (**Silveira et al., 1987**) rara, causa lesões cutâneas e ocorre no norte do Estado do Pará;
- *Leishmania (L.) mexicana* (**Biagi, 1953**) causa lesões cutâneas localizadas e eventualmente difusas e ocorre no México e América Central;
- *Leishmania (L.) amazonensis* (**Lainson & Shaw, 1972**) causa lesões cutâneas e eventualmente difusas, e ocorre desde a América Central até o norte, nordeste, centro-oeste e sudeste da América do Sul;
- *Leishmania (L.) venezuelensis* (**Bonfante-Garrido, 1980**) causa lesões cutâneas e ocorre na Venezuela;
- *Leishmania (L.) chagasi* (**Cunha & Chagas, 1937**) causa a forma visceral com febre, anemia, hepatoesplenomegalia, emagrecimento e ocorre do México ao norte da Argentina, com predomínio no nordeste brasileiro (Lainson *et al*, 1994; Atlas, 2006).

IV.3 Epidemiologia da Leishmaniose

A leishmaniose constitui um importante problema de saúde pública, que afeta cerca de 88 países distribuídos pela maioria dos continentes. Estima-se que 350 milhões de pessoas ao redor do mundo corram o risco de contrair a doença, estando a incidência anual em 2 milhões e a prevalência em 12 milhões de casos (MS, 2007). A leishmaniose é considerada uma das seis principais doenças infecciosas e a segunda com maiores

índices de óbitos, cerca de 59 mil casos, perdendo apenas para a malária (Desjeux, 2004; Alves *et al*, 2008). No Novo Mundo, existem dois tipos de leishmaniose: leishmaniose visceral americana; e leishmaniose cutânea ou tegumentar americana (Grimaldi Junior & Tesh, 1993; MS, 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea e cutânea ocorrem no Brasil, Bolívia, Peru, Afeganistão, Irã, Arábia Saudita e Síria (MS, 2007). A leishmaniose tegumentar americana (LTA) abrange desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, não ocorrendo no Uruguai e no Chile. Devido a sua ampla distribuição geográfica, a leishmaniose cutânea foi notificada em 19 unidades da federação na década de 80, enquanto que em 2003 foram confirmados casos autóctones em todos os estados brasileiros. A partir desta década, registrou-se um aumento no número de casos anuais variando de 3000 para 35748 (1995). No período de 1991 a 2010 a incidência média anual tem sido de aproximadamente 27.374 casos registrados e com coeficiente de detecção média de 16,4 casos/100.000 habitantes. Ao avaliar o perfil da LTA no Brasil podemos observar uma crescente expansão geográfica com uma maior predominância de casos na Região Norte com cerca de 36,4% do total de casos registrados no período de 1991 a 2010 e com coeficientes médios de 80 casos /100.000 habitantes, seguido da região Centro-Oeste 36,5 casos/100.00 habitantes e da Região Nordeste com 19,9 casos/100.000 habitantes (MS, 2010).

No Sudeste da Bahia, a região de Corte de Pedra tem uma alta incidência de LTA. Na década de 80 eram diagnosticados cerca de 200 casos anuais de LTA, mas a partir de 2009, mais de mil novos casos anuais passaram a ser registrados na região

(Jirmanus *et al*, 2012). A leishmaniose disseminada aumentou mais de dez vezes sua incidência em relação às demais formas de LTA em CP ao longo dos últimos 20 anos (Guimarães *et al*, 2009).

Cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral (LV) são registrados em Bangladesh, Brasil, Nepal, Índia e Sudão. No período de 1998 a 2009, a incidência média anual de LV no Brasil foi de 3349 casos, com coeficiente de 1,97 casos/100.000 habitantes. A leishmaniose visceral americana (LVA) pode ser encontrada em 22 unidades federadas, atingindo as cinco regiões brasileiras. Dados de 2010 registraram a seguinte distribuição da LVA no Brasil: Região Nordeste, 47,1% dos casos; Norte 18,0%; Sudeste, 17,8%; Centro-Oeste, 8,6%; e Sul 0,1%, sendo mais frequente no sexo feminino e em crianças. Esta forma da doença é considerada grave quando não diagnosticada precocemente, podendo resultar em até 90% de óbito entre os não tratados (MS, 2010).

IV.4 Ciclo Evolutivo da *Leishmania sp.*

O ciclo biológico da *Leishmania* é do tipo heteroxênico, passando o parasito por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado, e outra extracelular no inseto vetor. Predominam as formas amastigotas e promastigotas nesse ciclo. As formas amastigotas são encontradas em células do sistema fagocítico mononuclear apresentando formato ovoide ou esférico, citoplasma com presença de vacúolos, um único núcleo, cinetoplasto e rudimento flagelar. As amastigotas medem 2,0-3,0µm de diâmetro a depender da espécie. As formas promastigotas estão situadas no trato digestivo e intestinal dos flebotomíneos, apresentando contorno alongado, presença de

flagelo, citoplasma com pequenos vacúolos e núcleo apresentando posições variadas (Pearson & Sousa, 1995; Medeiros & Roselino, 1999). O tamanho das promastigotas varia entre 15 - 26µm de comprimento por 2,0- 3,0 µm de largura. No Novo Mundo (Américas), a transmissão da doença se faz pela picada do flebotomíneo do gênero *Lutzomyia* e, no Velho Mundo, (Europa, África e Ásia) pelo gênero *Phlebotomus* (Pearson & Sousa, 1995; Gontijo & Carvalho, 2003; Bates, 2007;).

IV.4.1 Ciclo no vetor

O flebotomíneo, ao fazer o repasto sanguíneo em pessoas ou animais infectados, ingere as formas amastigotas encontradas nos macrófagos infectados, que se convertem em promastigotas no intestino do vetor após sucessivos processos de multiplicação por divisão binária. As formas promastigotas se transformam em promastigotas metacíclica, forma infectante, através de um processo denominado metaciclogênese. Estas formas migram para a faringe e cavidade bucal do inseto, aptas a penetrarem nas células dos hospedeiros vertebrados no próximo repasto sanguíneo do vetor (MS, 2007).

IV.4.2 Ciclo no Hospedeiro

O flebótomo fêmea infectado, ao fazer a hematofagia no hospedeiro vertebrado, regurgita as formas promastigotas juntamente com a saliva. Os parasitos e a saliva penetram na pele através de uma solução de continuidade. A saliva deste inseto apresenta um papel importante na infectividade das formas promastigotas, pois funciona como vasodilatador e imunossupressor da resposta do hospedeiro vertebrado. Após a penetração, as promastigotas metacíclicas penetram nas células do sistema fagocitário mononuclear (célula alvo) por um processo de fagocitose mediada por receptores e

ligantes na superfície dos macrófagos. No interior dessas células, as promastigotas se transformam em amastigotas envolvidas pelo vacúolo parasitóforo, que as separa do citoplasma celular. Os parasitos, dentro dos macrófagos, se multiplicam por divisão binária no interior dos vacúolos fagocitários. Após a lise dos macrófagos as formas amastigotas são liberadas, sendo novamente fagocitadas por outros macrófagos, dando continuidade ao processo infeccioso (Pearson & Sousa, 1995; Medeiros & Roselino, 1999; MS, 2007).

IV.5 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA tem sido considerada uma das principais afecções dermatológicas, observando-se um crescimento do número de casos e da expansão geográfica da doença. A LTA é causada por parasitos dos complexos *L. mexicana* e *L. braziliensis*. No Brasil, sete espécies dermatólicas foram identificadas, capazes de causar a doença nos seres humanos, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. Dentre as espécies de importância se destacam *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis*. As demais espécies, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*, foram recém-identificadas nas regiões Norte e Nordeste (Pearson & Sousa, 1995; Medeiros & Roselino, 1999; Rath *et al*, 2003; Goto & Lindoso, 2010).

Os indivíduos infectados com *L.(L.) amazonensis* apresentam lesões cutâneas localizadas, podendo desenvolver a forma cutânea difusa da leishmaniose (LCD). Essa espécie ocorre, sobretudo, em florestas primárias e secundárias com predominância em algumas regiões da Amazônia Legal, Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul. Seu

principal vetor é o *L. flaviscutellata*. Os roedores silvestres e marsupiais são seus principais reservatórios (Medeiros & Roselino, 1999; Costa, 2005).

Os indivíduos infectados com *L.(V.) guyanensis* podem apresentar lesões cutâneas ulceradas únicas ou múltiplas, devido a uma série de picadas de diversos flebotomíneos infectados. Essa espécie ocorre em florestas de terra firme sendo restrita à Região Norte, estendendo-se para as Guianas. Seu principal vetor é o *L. umbratilis*. O tamanduá, gambá e a preguiça são seus principais reservatórios (Medeiros & Roselino, 1999; Costa, 2005).

A *L. (V.) braziliensis* ocorre em áreas de atividades agrícolas com desmatamento e em ambiente peridomiciliar. Essa espécie tem uma ampla distribuição geográfica estendendo-se desde a América Central até o Norte da Argentina. Acomete a pele e as mucosas, sendo conhecida como úlcera de Bauru, ferida brava, ferida seca e bouba, podendo evoluir para cura espontânea. Esta espécie pode causar as três formas de doença descrita abaixo: cutânea, mucosa e disseminada (Lainson *et al*, 1994; Medeiros & Roselino, 1999; Costa, 2005).

- **Leishmaniose cutânea (LC)** – caracteriza-se pela presença de uma lesão ulcerativa na pele, geralmente nos membros, com bordas elevadas e bem delineadas, formato arredondado ou oval, base eritematosa, sem envolvimento das superfícies mucosas. Esta é a forma mais comum e leve da doença. Os pacientes que desenvolvem LC apresentam uma resposta Th1 moderada e bem regulada aos antígenos parasitários com intradermoreação de Montenegro (IDRM) positiva. As lesões apresentam pouco

parasitos e os pacientes respondem bem ao tratamento com antimoniais (Bacellar *et al*, 2002; Schriefer *et al*, 2004).

- **Leishmaniose mucosa (LM)** – caracteriza-se pela presença de lesão na mucosa localizada no septo nasal, palato, laringe e faringe, sendo muitas vezes desfigurantes. Na mucosa do nariz e boca pode haver perfurações com dano total ou parcial das áreas afetadas. Na LM a resposta pró-inflamatória aos antígenos parasitários é exagerada, com níveis elevados de $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ e IL 17, produzida principalmente pelos linfócitos TCD4+. A IDRM é em geral positiva e as lesões também apresentam poucos parasitos e os pacientes são frequentemente refratários ao tratamento com antimoniais (Bacellar *et al*, 2002; Schriefer *et al*, 2004).

- **Leishmaniose disseminada (LD)** – caracteriza-se pela presença de lesões múltiplas que podem ser ulceradas ou não, acometendo duas ou mais regiões do corpo, podendo ser precedidas por período febril transitório. Esta forma clínica não deve ser confundida com leishmaniose cutânea difusa (LCD), causada por parasitos do complexo *L.mexicana* e clinicamente e imunologicamente bem distinta da LD. Os pacientes de LD apresentam uma diminuição na produção de $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ aos antígenos parasitários em relação aos pacientes de LC (Machado *et al*, 2011). De 30 a 50% dos pacientes de LD apresentam IDRM negativo. As lesões apresentam poucos parasitos. É a forma menos responsiva ao tratamento com antimonial. A LD é uma forma emergente de LTA, sobretudo no norte e nordeste do Brasil (Turetz *et al*, 2002; Schriefer *et al*, 2004).

IV.6. Tratamento

O tratamento para leishmaniose durante longos anos foi à base de tártaro emético, tendo sido descoberto pelo brasileiro Gaspar Vianna em 1912 (Peter, 1981). Após três anos, na Itália, se constatou também a sua eficácia na leishmaniose visceral. Em 1920, Brahmachari desenvolveu a primeira droga a base de antimônio pentavalente, uréia estibamina (Peter, 1981). Schmidt, em 1936, adentrou na terapêutica o gluconato de antimônio sódico, o Pentostam®, não comercializado no Brasil, sendo utilizado no Velho Mundo (Rath *et al*, 2003). Na França, emergiu durante a Segunda Guerra Mundial um medicamento alternativo, o antimoniato N-metil glucamina, o Glucantime®, sendo utilizado como droga de primeira linha no tratamento da leishmaniose visceral e cutânea no Novo Mundo (Rath *et al*, 2003).

Como uma forma de padronização do esquema terapêutico, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que a dose seja calculada em mg Sb^v/Kg/dia. O Glucantime® é comercializado em frasco de 5ml, contendo 1,5g de antimoniato bruto e 405mg de Sb^v, o equivalente 81mg Sb^v/ml. Nas formas cutâneas e disseminadas o Ministério da Saúde preconiza a dose de 10 a 20mg Sb^v/Kg/dia, durante 20 dias não ultrapassando a dose máxima de 15 ml/dia ou três ampolas. Em caso de não cicatrização das lesões no período de três meses, o esquema terapêutico deverá ser prolongado por 30 dias. Na forma mucosa, a OMS recomenda 20mg Sb^v/Kg/dia durante 30 dias consecutivos. Em caso de falha deverá ser repetido por mais 30 dias.

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não foi totalmente esclarecido. Estudos realizados sugerem que seja uma droga que é convertida após sua

administração em antimônio trivalente. É provável que os antimônios atuem na inibição da glicólise e oxidação dos ácidos graxos, minimizando os níveis de adenosina (ATP) e guanosina trifosfatos (AGP) e se convertendo em trivalente, a forma ativa contra o parasita (Berman *et al*, 1985-1987; Rath *et al* 2003; Ouellette *et al*, 2004). Os antimoniais pentavalente (Sb^V) não se ligam aos eritrócitos. Desta forma, atingem níveis plasmáticos significativos com uma menor taxa de toxicidade em relação à forma trivalente (Sb^{III}) (MS, 2006). Em um estudo comparativo entre o N-metil Glucamina e o Estibogluconato de Sódio, realizado por Deps e colaboradores em 2000, evidenciou-se, através de uma avaliação hepática, os elevados índices de toxicidade na forma trivalente. Em uma coorte de 151 pacientes com LC no estado Mato Grosso, 47% apresentaram falha terapêutica, tendo como principais fatores de risco presença de mais de três lesões, irregularidades no tratamento e peso acima de 68kg (Rodrigues *et al*, 2006).

Estes tipos de medicamentos não têm se mostrado eficazes, sendo clara a presença de cepas/isolados resistentes. Soma-se a isto o fato destas drogas apresentarem sérios efeitos colaterais como alterações cardíacas, pancreáticas ou renais, além de vômito, náuseas e mialgia o que incorre em elevada taxa de abandono dos tratamentos.

A refratariedade ao antimonial tem se elevado nas diversas formas clínicas da doença. Esquemas terapêuticos têm sido alterados em relação às doses terapêuticas e duração do tratamento. Sundar e colaboradores (2000) no estado de Bihar na Índia, uma região endêmica para leishmaniose, dos 209 pacientes tratados com antimonial 65% apresentaram falha terapêutica, revelando claramente a falta de eficácia ao antimonial, com elevados índices de refratariedade, na LV. Tem sido uma constante o insucesso

terapêutico, onde diversos fatores podem influenciar, como a sensibilidade das espécies de *Leishmania*, região geográfica, farmacocinética e a resposta imune do hospedeiro (Gotto & Lindoso, 2010).

No caso de ineficácia aos antimoniais pentavalentes, são usadas as drogas de segunda escolha no tratamento da leishmaniose são: Anfotericina B e pentamidina. A anfotericina B é um antifúngico derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, com atividade leishmanicida contra formas evolutivas extra e intracelulares das espécies de *Leishmania*. Esta droga é comercializada em ampolas contendo 50mg de desoxicolato de sódio liofilizado. Recomenda-se 1mg/kg/dia de forma contínua ou intercalada, não ultrapassando a dose de 50mg/ aplicação. Nas formas cutâneas se administra 1 a 1,5g e na forma mucosa 2,5 a 3g. Os pacientes apresentam efeitos adversos, sendo considerados os mais importantes à insuficiência renal, leucopenia e anorexia. É proibido o uso em nefropatas, hepatopatas e cardiopatas. Aconselha-se o monitoramento semanal através de eletrocardiograma e exames laboratoriais para avaliar as funções renal e hepática (Rath *et al* 2003; MS, 2007).

A Anfotericina B apresenta atividade seletiva contra fungos, *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*, devido à alta afinidade pelo ergosterol. Esta droga interage com o esterol presente na membrana do parasito, desencadeando alterações morfológicas e causando a morte celular. Isso resulta em uma melhor eficácia e tolerância à droga (Pearson & Sousa, 1995; Croft & Coombs, 2003; Croft *et al* 2006; De Lima *et al*, 2007).

A Anfotericina B incorporada em lipossomos possui uma menor toxicidade em relação à forma padrão (Pearson & Sousa, 1995). A comercialização desta droga é feita sob a forma de ampola contendo 50mg de Anfotericina B lipossomal liofilizada. A droga é aplicada por via endovenosa em dose única de 1-4mg/kg/dia, não ultrapassando doses de 1-1,5g na forma cutânea e 2,5-3g na forma mucosa da LTA (MS, 2007). Pacientes com LM, não respondedores ao antimonial, tratados com anfotericina lipossomal na dose de 2mg/kg/dia, por 22 dias acompanhados por um período de 26 a 38 meses, apresentaram cura (Sampaio & Marsden, 1997).

A pentamidina é uma das drogas de segunda escolha, sendo utilizada em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano. Esta droga interfere na síntese do DNA da *Leishmania*, alterando a morfologia do cinetoplasto e causando a morte do parasito (Gotto & Lindoso, 2010). Na Colômbia, pacientes tratados com pentamidina administrada na dose de 2mg/kg em dias alternados apresentaram 96% de cura (Soto-Mancipe *et al*, 1993). No Brasil, uma comparação entre a eficácia do isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana, e a de N-metil-glucamina administrada na dose de 20mg Sb^V/kg/dia durante 20 dias em pacientes de LC, mostrou uma semelhança entre as drogas. Contudo a pentamidina oferece um curto tempo de tratamento e menores alterações eletrocardiográficas (De Paula *et al* 2003). Esta droga é administrada por via intramuscular na dose de 4mg/kg/dia, em dias alternados, não ultrapassando a dose máxima de 2g. Este medicamento tem ação no metabolismo da glicose podendo causar diabetes nos pacientes (MS, 2007).

O medicamento utilizado no tratamento da leishmaniose por via oral foi a miltefosina, uma droga anticancerígena. Empregada nos casos de LV na Índia, a

miltefosina apresentou resultados satisfatórios (Rath *et al*, 2003). Em um ensaio randomizado realizado na região de Corte de Pedra, mostrou-se a eficácia da miltefosina no tratamento da LC. Noventa pacientes foram incluídos no estudo, destes sessenta tratados com miltefosina e trinta pacientes tratados com antimonial. A miltefosina foi administrada oralmente com doses diárias de 2,5mg/Kg. Após seis meses de tratamento, a taxa de cura foi maior no grupo que utilizou miltefosina (75%), em relação ao grupo que utilizou antimonial (53,3%). A incidência de efeitos adversos foi semelhante nos dois grupos. Este estudo demonstrou que a terapia com miltefosina é mais eficaz do que a terapia padrão, sendo seguro no tratamento da LC causada pela *L.(V.) braziliensis* em Corte de Pedra (Machado *et al*, 2010).

Esquemas alternativos vêm sendo utilizado nos casos de refratariedade, associados ao antimonial pentavalente, como pentoxifilina, alopurinol, sulfato de paramomicina e imunoterápicos.

O fator de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é uma proteína provinda da medula óssea, que funciona como estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (Almeida *et al*, 1999). Estudos mostram a eficácia do GM-CSF no tratamento da leishmaniose, provavelmente devido a sua capacidade de promover a apresentação de antígenos e melhorar a cicatrização das lesões. Na área endêmica de Corte de Pedra, dois estudos randomizados, duplo cegos, realizados com vinte pacientes, demonstraram a eficácia do GM-CSF no tratamento da LC. Em Almeida e col. (1999), dez pacientes receberam 200µg de GM-CSF por via intralesional, no início do tratamento e após sete dias, em associação com antimonial, na dose de 20mg/Kg/dia, durante 20 dias. O grupo controle recebeu antimonial e solução

salina como placebo. O grupo que recebeu GM-CSF apresentou cicatrização das lesões em um intervalo de tempo significativamente menor que o grupo controle. No outro estudo o GM-CSF foi aplicado de forma tópica, durante nove doses de GM-CSF, 3 doses/semana, em associação ao tratamento padrão da leishmaniose. O grupo tratado com GM-CSF apresentou cicatrização total das lesões, enquanto o grupo controle apresentou 50% de cura (Santos *et al*, 2004). Na formulação tópica, o GM-CSF não causou efeitos colaterais e levou a redução do custo do tratamento.

A pentoxifilina é derivada da dimetilxantina, sendo utilizada como vasodilatador periférico. Esta droga inibe a produção de TNF e a funcionalidade dos neutrófilos, suprimindo a transcrição do gene para TNF. O TNF induz a produção de óxido nítrico, resultando em morte celular (Almeida *et al*, 2005). O uso de antimonial associado à pentoxifilina tem se mostrado eficaz nos casos de LC e LM. Pacientes com LM em Corte de Pedra foram tratados por trinta dias com esquema padrão de antimonial associado à pentoxifilina, 400mg, por via oral, três vezes ao dia. Todos os onze pacientes do grupo com pentoxifilina apresentaram cura com um único curso de tratamento, enquanto que dos doze tratados com placebo cinco precisaram fazer um segundo curso com antimonial (Machado *et al*, 2007). Em outro estudo, realizado no Irã, 81,3% dos pacientes com LC causada pela *L.major*, que usaram glucantime, 20mg/kg/dia, durante vinte dias, associado à pentoxifilina, três vezes ao dia, apresentaram cicatrização completa das lesões (Sadeghian & Nilforoushzadeh, 2006). O dano tecidual ocorrido na LC, e principalmente na LM, onde o insucesso ao antimonial ocorre em cerca de 42% casos, está associado com alta produção de TNF. A

pentoxifilina funciona como um inibidor de TNF, resultando na melhora clínica destes pacientes.

IV.7. Epidemiologia Molecular

As espécies de *Leishmania* apresentam uma grande variabilidade genética, fator que lhe confere a produção de diferentes fenótipos associados a diversos desfechos clínicos e terapêuticos (Tibayrenc et al, 1990-1991). Estudos genéticos populacionais são capazes de detectar se a distribuição de genótipos em populações naturais são consequências da reprodução sexual (segregação e recombinação), com troca de informação genética em diferentes células. Enquanto a segregação refere-se à presença de alelos em um único *locus*, a recombinação é a relação entre os alelos em diferentes *loci* (Tibayrenc et al, 1990-1991). A *Leishmania* é diploide, assexuada, reprodução clonal, o que reforçam a variabilidade intraespecífica, apresentando os genes estáveis intimamente ligados com um forte desequilíbrio de ligação, portanto, com grande importância médica e epidemiológica, podendo apresentar recombinação genética em algumas espécies (Tibayrenc et al 1990-1991; Cupolillo et al, 1998; Banulus et al, 1999-2002). Por pertencerem a ordem *Kinetoplastida* apresentam um DNA mitocondrial único ou kDNA, localizado anteriormente ao cinetossoma do flagelo (Simpson, 1987). O genoma da *leishmania* varia de acordo com a espécie sendo organizados entre 34 a 36 pares de cromossomos (Stilles et al, 1999). Devido a grande diversidade da espécie, métodos com elevado poder discriminatório com capacidade de diferenciar e caracterizar as populações dos parasitos é de suma importância para um melhor diagnóstico e prognóstico das infecções (Grimaldi Jr. & McMahon-Pratt, 1996; Cupolillo et al, 1998).

Os anticorpos monoclonais têm sido empregados para identificação de espécies de leishmania, para o desenvolvimento de testes diagnósticos e moléculas associadas com a virulência e patogenicidade do parasito, bem como, antígenos leishmanicida a serem utilizados no processo de vacinação como imunoproteção na leishmaniose (Grimaldi & Tesh, 1993).

Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) é um método fenotípico utilizado para caracterizar microorganismos patogênicos. Este método baseia-se na análise eletroforéticas de isoenzimas tendo a capacidade de analisar genes e detectar polimorfismos dentro das espécies (Cupolillo *et al*, 1998; Vazquez & Berron, 2004). Considera-se como método genético direto, que analisa a mobilidade eletroforéticas com um número definido, entre 15 e 20, de enzimas metabólicas em géis de amido ou poliacrilamida, correspondendo a variações no *locus* ou no gene codificante de cada enzima. A variante alélica, originada de cada variante e os diferentes alelos de cada um dos genes forma o perfil alélico que se define como padrão eletroforético, denominado zimodema (Cupolillo *et al*, 1998; Vazquez & Berron, 2004).

O *multilocus sequence typing* (MLST) as variações nos diferentes *locus* são detectadas de forma direta na sequência do DNA dos fragmentos dos genes selecionados, permitindo identificar clones e linhas clonais, principalmente em populações bacterianas. Estudos de genética populacionais descobriram que regiões específicas dos genes apresentavam uma grande variabilidade, enquanto o restante do *locus* se mostrava conservador (Smith *et al*, 1999; Feil *et al*, 1996). Sendo assim, analisou-se o gene em pelo menos sete fragmentos internos com aproximadamente 450-500 pares de base, proporcionando um elevado poder discriminatório, sendo

inicialmente desenvolvido para 11 espécies de bactérias patogênicas com grande importância em saúde pública, dentre as principais se destacam: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* e *Enterococcus faecium*, (Maiden *et al*, 1998; Enright & Spratt *et al*, 1998-2000). O principal benefício deste método é que os dados de sequência são precisos e únicos, permitindo uma expansão global por espécie, sendo colocado em um site de banco de dados através da internet, produzindo um importante recurso na epidemiologia molecular, os quais poderão ser comparados com os demais perfis alélicos (Maiden *et al*, 1998).

A técnica de random amplified polymorphic DNA (RAPD) é efetiva na obtenção de marcadores moleculares em todos os microorganismos, sendo adequado para constituição das filogenias das espécies e como características diagnósticas das linhagens de espécies e subespécies (Tybarenc *et al*, 1993). Este método identifica polimorfismos que são detectados como fragmentos de DNA presentes em algumas cepas apresentando um poder discriminatório com custo efetivo baixo, além de não necessitar de um conhecimento prévio do genoma avaliado (Tybarenc *et al*, 1993). Em um estudo realizado pelo nosso grupo na área endêmica de CP Schriefer e colaboradores (2004) avaliaram a hipótese que o polimorfismo parasitário pode influenciar nos desfechos clínicos da doença caracterizando a estrutura populacional dos isolados de *L.(V.) braziliensis* em CP. Para certificar-se desta hipótese compararam um isolado de *L.major*, dois de *L.(V.) braziliensis* não pertencentes à região de CP, um *L.amazonensis* em CP, e 45 isolados de *L.(V.) braziliensis* obtidos nos últimos 10 anos das diversas formas clínicas de LTA em CP. Utilizaram quatro protocolos de RAPD

para genotipagem dos isolados parasitários empregando três diferentes primers sozinhos ou em combinação. Os perfis eletroforéticos, em sua maioria, foram exclusivos entre as espécies revelando polimorfismos nos 45 isolados de *L.(V.) braziliensis* de CP exibindo oito diferentes padrões de RAPD. O dendrograma de similaridade gerado a partir da comparação destes perfis eletroforéticos dos RAPDs obtidos para cada isolado revelou uma estrutura multiclonal de *L.(V.) braziliensis* com clados parasitários associados às formas clínicas de LTA em CP. Baseado no estudo anterior, Queiroz e colaboradores (2012) a partir dos amplicons da reação em cadeia de polimerase (PCR), gerados pela amplificação do RAPD do DNA genômico dos isolados de *L.(V.) braziliensis* dos pacientes de CP, os amplicons foram clonados, sequenciados e comparados. Foram identificados seis *loci* polimórficos entre as cepas dos parasitas. Os testes de associação entre o polimorfismo de um único nucleotídeo (SNPs), inserção e deleções e SNPs/indel baseado nos haplótipos destes seis *loci* revelaram uma forte associação com a forma disseminada da doença e a espécie *L.(V.) braziliensis*.

Neste estudo, foram analisadas as sequências de fragmentos amplificados do genoma do parasito para identificar genótipos de *L.(V.) braziliensis* associados a desfechos terapêuticos. A confirmação de que a presença de cepas de *Leishmania sp.* possam apresentar resistência ao Sb^v, posterior detecção de marcadores parasitários, através da análise de seus polimorfismos, seria de grande importância, pois poderia ser explorado na melhoria do manejo terapêutico do paciente, ao detectar casos com maior propensão à má resposta terapêutica ao Sb^v. Isso permitiria o emprego precoce de esquemas alternativos nesses pacientes, diminuindo o tempo total de tratamento e de morbidade devido a LTA.

V. HIPÓTESE

Tem sido amplamente reconhecido que a *L.(V.) braziliensis* apresenta um elevado grau de polimorfismo genético e fenotípico, e que a preocupação em relação à refratariedade ao tratamento tem se elevado principalmente nas Américas. Na área endêmica de Corte de Pedra um estudo realizado pelo nosso grupo mostrou que isolados de *L.(V.) braziliensis* são multiclonais, com diferentes clones associados às formas clínicas de LTA (Schriefer *et al*, 2004). Desta forma a hipótese deste projeto foi que o polimorfismo parasitário também influencia nos desfechos terapêuticos e que a susceptibilidade das promastigotas *in vitro* varia de acordo com a forma clínica da doença e que os pacientes refratários ao tratamento são infectados por cepas não respondedoras ao antimonial. Para testar estas hipóteses buscamos associações entre isolados parasitários provenientes de diferentes formas de LTA e de seus genótipos com resposta terapêutica e comparamos as respostas terapêuticas *in vivo* e *in vitro* e as diferentes formas clínicas de LTA com as respostas *in vitro*, no intuito de encontrar uma correlação positiva entre a resposta clínica dos pacientes ao tratamento e a sensibilidade *in vitro*.

Avaliamos, através de um mapeamento, a distribuição dos casos refratários e responsivos a terapêutica na área endêmica de CP. A nossa hipótese é que os pacientes refratários ao tratamento apresentam distribuição geográfica diferentes dos pacientes responsivos, e/ou uma compartimentalização dos casos refratários.

VI. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses constituem um espectro de doenças causado por uma variedade de espécies de *Leishmania* transmitidas pela picada de flebotomíneos infectados. A leishmaniose tegumentar americana (LTA) tem alta incidência no estado da Bahia, sendo distribuída em áreas de atividade agrícola, com desmatamento. A doença afeta indivíduos jovens e mesmo crianças, frequentemente atingindo indivíduos produtivos. No Brasil tem-se observado um elevado crescimento do número de casos de LTA tanto em magnitude como em expansão geográfica (MS, 2007).

A busca de biomarcadores associados à resposta terapêutica é de fundamental importância para as populações endêmicas. Explorar marcadores parasitários de resistência/susceptibilidade a drogas seria uma mudança bem vinda na abordagem diagnóstica destes pacientes, uma vez que achados recentes tem mostrado que, pelo menos na *L. tropica*, cepas resistentes a uma droga antimonial são cruzadamente resistentes a outras drogas com a mesma base química, mas sensíveis a uma terapia de segunda linha (Hadighi *et al*, 2007).

Reforçando o papel da genética parasitária na resistência/susceptibilidade ao antimônio, diferentes trabalhos têm enfatizado que a susceptibilidade aos antimoniais varia marcadamente entre espécies e frequentemente entre cepas geograficamente distantes de uma mesma espécie de *Leishmania* (Hadighi *et al*, 2007). Desta forma, a busca de biomarcadores parasitários seria de suma importância para o eventual desenvolvimento de protocolos diagnósticos e de manejo clínico baseados em ferramentas que permitam antecipar o prognóstico terapêutico dos casos de LTA.

VII. MATERIAIS E MÉTODOS

VII.1. Área de estudo

Corte de Pedra, município de Tancredo Neves, localiza-se em uma área rural na região sudeste do estado da Bahia, nordeste do Brasil. Os flebotomíneos *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmany* e *L.(N.) intermedia*, que transmitem *L.(V.) braziliensis*, são endêmicos em Corte de Pedra. Moradores desta área trabalham principalmente na agricultura, a qual é muitas vezes realizada em matas primárias e secundárias. Existe pouca migração da população dentro e fora desta região. A média de tempo de permanência dos participantes do estudo em seus endereços no momento do diagnóstico e amostragem do parasito foi de 17 anos; 90% dos participantes do estudo viviam em fazendas.

VII.2 População de estudo e Aspecto Ético

Os pacientes de LTA focados neste estudo são oriundos da região de Corte de Pedra, sudeste da Bahia. Este município se encontra a 280 Km de Salvador, capital da Bahia, onde localiza-se o Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos da UFBA. Os isolados dos parasitos foram aspirados das lesões e cultivados em meio, de pacientes de LC, LM e LD diagnosticados no período de 2008 à 2011 atendidos no posto de saúde de Corte de Pedra, bem como da comunidade circundante, que consentiram participar do estudo. Uma vez que não é possível realizar cultura e isolamento do parasito em todos os casos de LC devido aos elevados números de casos realizamos aspiração da lesão em dois pacientes de LC para cada paciente de LM e LD identificado no posto de saúde. Os dados demográficos dos pacientes estão

descrito na tabela abaixo. Os procedimentos adotados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal da Bahia e Conselho Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP 128/2008, 17/03/2008.

Dados clínicos e demográficos dos pacientes abordados no estudo

Características	
Média das idades	2-70 anos (\pm 29)
Gênero M/F (n)	75/33 (108)
Falha terapêutica após 2 cursos com antimonial ou uso anfo B	33/108
Uso de antibiótico antes do tratamento com antimonial	24/108
Tratamento anterior com antimonial	02/108

VII.3 Definição da doença

A LC consiste de uma lesão ulcerada na pele em um único local do corpo, com não mais de duas lesões secundárias ou satélite, sem evidência clínica de envolvimento mucoso.

A LM foi definida como a presença de uma lesão mucosa ulcerada ou inflamada em um local que não era contíguo com qualquer lesão cutânea.

A LD foi definida como 10 ou mais lesões de pele de diversos tipos (acneiforme, papular, nodular e/ou ulcerada) localizados em duas ou mais parte do corpo (cabeça,

tronco, braços e pernas). Em adição a estes critérios clínicos, casos que tiveram dois ou três dos seguintes: reação de hipersensibilidade tardia positiva ao antígeno de *Leishmania* (Reação de Montenegro), sorologia positiva, e/ou parasitos encontrados em amostras de biópsia de tecido por histopatologia.

VII.4 Critérios de Inclusão e Exclusão

VII.4.1 Critérios de Inclusão: Pacientes com LC, LM e LD de *L.(V.) braziliensis* recrutados da área endêmica de Corte de Pedra, município de Tancredo Neves no Sudeste do estado da Bahia. Após explicação verbal ou escrita (para aqueles que sabem ler) o termo de consentimento foi assinado pelo paciente maior ou por responsável legal em caso de menores de 18 anos. No Posto de Saúde de Corte de Pedra foram realizados o exame clínico, teste intradérmico de Montenegro e aspirado da lesão obtida em pacientes que se mostraram responsivos ou refratários ao antimônio.

VII.4.2 Critérios de Exclusão: portadores de doenças debilitantes como insuficiência renal, insuficiência hepática e diabetes mellitus, que tenham feito uso de drogas imunossupressoras ou apresentem condições que possam alterar a resposta imune ou contra indiquem a doação de sangue para a avaliação imunológica, a exemplo de gravidez ou idade <4 anos ou >65 anos.

VII.5 Definição de resposta terapêutica

Os pacientes que obtiveram resposta satisfatória até dois cursos com antimonial, ou em associação com a pentoxifilina 400mg por via oral três vezes ao dia, durante 20 a 30 dias, apresentando franca cicatrização das suas lesões foram considerados respondedores a terapêutica.

Os pacientes que obtiveram insucesso terapêutico após este período e utilizaram anfotericina B 0,5mg/kg/dia com doses variando de 1 - 1,5g três vezes na semana foram considerados pacientes refratários à terapêutica.

VII.6 Critérios de cura

O critério de cura, ou seja, de resposta satisfatória ao tratamento consiste na cicatrização completa da lesão, com epitelização e sem presença de processos inflamatórios. Caracteriza-se como falha terapêutica, a não cicatrização da lesão com aumento do processo inflamatório ao redor da lesão inicial ou recidiva das lesões após o término do tratamento.

VII.7 Amostra

Neste estudo foram incluídos 108 pacientes com LTA, destes noventa e um foram utilizados para o processo de genotipagem. Sessenta e sete pacientes com LC, dezessete com LD e sete com LM. Destes, sessenta e três pacientes se mostraram responsivos (69%) ao tratamento com antimonial pentavalente e vinte e oito (31%) refratários à terapêutica.

No experimento *in vitro* tivemos um total de sessenta e cinco isolados de *L.(V.) braziliensis*, um pequeno subgrupo da genotipagem com adição de novas amostras. Destes, Trinta e oito com LC, dezoito com LD e nove com LM.

VII.8 Isolamento da *L.(V.) braziliensis* a partir de casos de LTA em CP

Os isolados de *L.(V.) braziliensis* utilizados no presente estudo foram cultivados a partir de material aspirado das lesões mucosas ou da borda das úlceras na pele dos

pacientes de LTA em CP. O material aspirado foi imediatamente suspenso em meio de cultura NNN com LIT e incubado a 25°C por uma a até duas semanas. A suspensão foi então transferida para o meio Schneider, suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, e incubada a 25°C por até 2 semanas.

VII.9 Determinação da espécie de *Leishmania* isolada dos casos de LTA

A determinação da espécie parasitária isolada foi baseada em PCR em tempo real. Parte de cada suspensão foi usada para os ensaios de genotipagem e resposta *in vitro* ao Sb^v, parte foi estocada e congelada em DMSO, em nitrogênio líquido.

VII.9.1 Identificação dos *loci* genômicos da *L.(V.) braziliensis*, polimórficas na população parasitária de CP.

A seleção dos alvos genômicos de *L. (V.) braziliensis* a serem usados nas genotipagens foi baseada nos padrões eletroforéticos de amplicons de DNA genômico de *L.(V.) braziliensis* gerados utilizando três protocolos de RAPD (Schriefer *et al*, 2004), descrito acima. Esses *loci* foram novamente amplificados por RAPD de cada um de nove isolados de *L. (V.) braziliensis*, utilizando os iniciadores e protocolos anteriormente descritos (Schriefer *et al*, 2004). As bandas de DNA resultantes foram clonadas no vetor pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, Inc.) de acordo com as instruções do fabricante. Plasmídeos foram preparados a partir de seis clones de bactérias representativos de cada reação de transformação. Em seguida, os insertos desses plasmídeos foram sequenciados. Após o alinhamento das sequências homólogas, seis *loci* polimórficos (CHR 24/3074, CHR 26/765, CHR 28/ 195696, CHR 28/425451, CHR 32/1356278, CHR 35/335652) foram identificados.

VII.9.2 Amplificação por PCR e clonagem do *locus* CHR24/3074 da *L.(V.) braziliensis*

Com base nas sequências geradas, durante os ensaios preliminares acima descritos, seis pares de primers foram desenhados capazes de amplificar seis *loci* polimórficos do genoma da *L.(V.) braziliensis* de CP por PCR. Um par de primer foi utilizado para amplificar o *locus* CHR24/3074 dos 91 isolados de *L.(V.) braziliensis*, baseado no estudo de Queiroz e colaboradores (2012) que mostraram este *locus* polimórfico com um aumento do risco associado à forma disseminada da doença.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50µl contendo: 1 µl de DNA alvo; 0,04mM(50pmol) para cada oligonucleotídeo iniciador (INVITROGEN Life Technologies, Inc.); dNTPs a 10mM (Gibco BRL, division of INVITROGEN, GAITHERSBURG, EUA); MgCl₂ a 50mM (INVITROGEN Life Technologies, Inc.); 0,2 U de taq platinum DNA polimerase (INVITROGEN Life Technologies, Inc.); e 5 µl de tampão 10x (INVITROGEN Life Technologies, Inc.). As amplificações foram realizadas em termociclador PCR GeneAmp 9600(Perkin Elmer Inc., MA, EUA). Foi empregado o protocolo de termociclagem a seguir: uma etapa de desnaturação 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 58°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; e uma etapa final de extensão de 10' a 72°C. Os produtos de reação foram então separados por eletroforese em gel de agarose a 1,3% por 50 minutos a 120volts em tampão TBE 0,5x (0,04 Tris – HCl – Borato e 1mM EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídeo a 0,5µg/ml e visualizados através de transiluminador UV acoplado a um sistema de captura eletrônica de imagens (UVP LabWorks Laboratory Imaging and Analysis System Inc., CA, EUA).

As bandas correspondentes do *locus* CHR 24/3074 amplificado por PCR, foram extraídas do gel usando o kit TA cloning® e clonados no vetor pCR®2.1 conforme instruções da Invitrogen detalhadas a seguir:

Reação de Ligação: Consiste na ligação de um fragmento de DNA a um vetor. O produto de PCR foi ligado a um vetor pCR®2.1, um plasmídeo linearizado que em suas extremidades possui desoxitimidinas complementares a desoxiadenosina das extremidades dos produtos de PCR. O volume final da reação de 10µl foi composta por 1µl de Tampão de Ligação 10x, 2µl de pCR®2.1, 1µl de T4 DNA Ligase, 5µl de água e 1µl do produto PCR. A reação foi mantida a 14°C por 16 horas.

Reação de Transformação: Para o processo de transformação foram acrescentados 2µl dos produtos das reações de ligação a alíquotas de células competentes de *E.coli* DH5α. As suspensões foram então incubadas em gelo por 30 minutos. Após este período as células passaram por um choque térmico com temperatura de 42°C por 3min e foram transferidas imediatamente para o gelo por 2 minutos. A cada suspensão foram adicionados 200 µl de LB líquido sem antibiótico, após as suspensões foram homogeneizadas gentilmente por inversão e incubadas em banho-maria a 37°C por 1 hora. Então as suspensões foram espalhadas em placas de petri com meio agar, as placas haviam sido acrescentados 40 µl X-Gal a 20mg/ml e 4 µl de IPTG a 200mg/ml ambos da (INVITROGEN Life Technologies, Inc.). As placas foram, então, incubadas overnight a 37°C. Após este período, as placas foram transferidas para a geladeira.

As colônias brancas de DH5α, contendo o provável inserto de interesse, foram inoculadas em 5ml do meio LB líquido com antibiótico e incubadas a 37°C overnight. Para a extração do DNA do plasmídial, 1,5 ml de cada cultura bacteriana foram

centrifugadas a 12000g por 1 minuto. Removeu-se o sobrenadante por aspiração, deixando-se o sedimento o mais seco possível. O sedimento foi então ressuspense por agitação em vortex com 100 µl de uma solução gelada contendo: 50mM de glicose, 10mM EDTA, 25mM Tris-Cl (ambos com PH 8,0). Após homogeneização a solução foi inicialmente mantida a temperatura ambiente por 5 minutos e depois acrescentou-se 200 µl de solução recém-preparada com: 1ml de SDS 10%, 2ml de NaOH 1N e 7ml de água estéril. Foram adicionados 150 µl de uma solução gelada de acetato de potássio (PH 4,8) com: 60 ml de acetato de potássio 5M, 11,5ml de ácido acético e 28,5 ml de água estéril. A mistura foi centrifugada a 12000g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para outro tubo contendo 450 µl fenol-cloroformio 1:1(v/v) foi novamente centrifugado a 12000g por 2 minutos a 4°C. Mais uma vez, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, contendo agora 1ml de etanol absoluto e mantido por 5 minutos a temperatura ambiente e 20 minutos a -70°C. O tubo foi centrifugado a 12000g por 10 minutos a 4°C, ao sobrenadante removido 1ml de álcool a 70% foi acrescentado ao precipitado. Após nova centrifugação por 10 minutos o sobrenadante foi desprezado e o precipitado seco ao ar e então ressuspense em 50µl de T.E com RNase A(Gibco BRL, division of INVITROGEN, GAITHERSBURG, EUA). A solução contendo o DNA foi armazenada a -20°C até o momento do uso.

Análise de Restrição: Para confirmação de que os insertos continham o *locus* CHR 24/3074 amplificado, cada plasmídeo recombinante foi submetido à digestão com endonuclease de restrição ECO RI (INVITROGEN Life Technologies, Inc.) e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,3% por 50 minutos, a 120volts, em tampão TBE 0,5x (0,04 Tris – HCl – Borato e 1mM EDTA). Os géis foram corados

com brometo de etídeo a 0,5µg/ml e visualizados através de transiluminador UV acoplado a um sistema de captura eletrônica de imagens (UVP LabWorks Laboratory Imaging and Analysis System Inc., CA, EUA), para se certificar dos tamanhos dos fragmentos clonados. Cada reação de digestão empregada na análise de restrição constituiu em: 1µl de Tampão 10x, 0,5 µl da enzima de restrição, 3,5 µl do DNA da minipreparação, e água estéril adicionada para um volume final da reação de 10 µl. A mistura foi incubada em banho- maria a 37°C por 1 hora.

VII.10 Preparo do meio de Cultura Líquido Luria-Bertani (LB)

Para o cultivo das bactérias de *Escherichia coli* foi utilizado o meio de cultura líquido Luria- Bertani (LB) composto pelas seguintes substâncias: 5g Bacto Tryptona, 2,5g Bacto Yeast Extract (DIFCO Laboratories, DETROIT, MICHIGAN, EUA), 2,5g de Cloreto de Sódio (REAGEN, Quimbrás, Rio de Janeiro, BRA) e 500 ml de água deionizada. O LB foi armazenado a 4°C até o momento do uso. O meio de cultura LB ágar foi preparado conforme descrito anteriormente com adição de ampicilina a 10mg/ml e 16g de Bacto- Agar (DIFCO Laboratories, DETROIT, MICHIGAN, EUA). Após autoclavagem, o meio foi distribuído em placas de petri e armazenado a 4°C.

VII.11 Preparo de Células *E. coli* DH5α Competentes para transformação química com DNA plasmidial

As células foram tornadas competentes a partir de uma alíquota estoque de *E. coli* armazenada a -70°C, em glicerol. As amostras foram inicialmente semeadas na placa de petri. Após uma incubação overnight a 37°C, uma colônia foi selecionada e inserida em 10ml de meio LB líquido e novamente incubada a 37°C em shaker orbital.

Então transferiu -se 1ml da cultura para outro tubo, previamente aquecido, contendo 0,1 a 0,2 litros do meio LB. A suspensão foi conforme descrito anteriormente até que a cultura atingisse uma DO_{600} de 0,2 a 0,3. Então a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 3000rpm, a 4°C, e ressuspensa com 1/5 (20 ml) do volume original em $CaCl_2$ (50mM) resfriado, e incubada em gelo por 30 minutos. Após nova centrifugação (5 minutos, 3000rpm, 4°C), as células foram ressuspensas em 1/10 (10 ml) do volume original $CaCl_2$ a 50mM com 20% de glicerol e aliqotada em frações de 0,2ml e mantidas a -70°C até o momento do uso.

VII.12 Sequenciamento e Genotipagem

Para a análise das sequências de ácidos nucleicos dos *loci* polimórficos, os insertos nos plasmídeos foram sequenciados, empregando-se um iniciador complementar para a sequência do bacteriófago M13 presente no vetor. Os sequenciamentos foram realizados na Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul). As sequências foram comparadas empregando-se o pacote de software Mega 4,0. Primeiro determinou-se a sequência consenso em todos os *loci*, comparando-se os *loci* homólogos nos diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis*. Então, as sequências de cada um dos seis *loci* foram analisadas para a identificação da ocorrência de SNPs e / ou indels entre os vários segmentos homólogos de DNA genômico parasitário comparados.

A fim de localizar fisicamente nos cromossomos homólogos da *L. (V.) braziliensis* os *loci* polimórficos detectados no genoma do parasita, a sequência de consenso de cada *locus*, obtido como descrito acima, foi baseada em cada um dos cromossomas do genoma completo da *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/75 / M2904, acessado no site

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Isto permitiu, por um lado, a identificação dos cromossomas contendo os *loci* e, então a determinação do ponto de partida para cada *locus* dentro destes cromossomas.

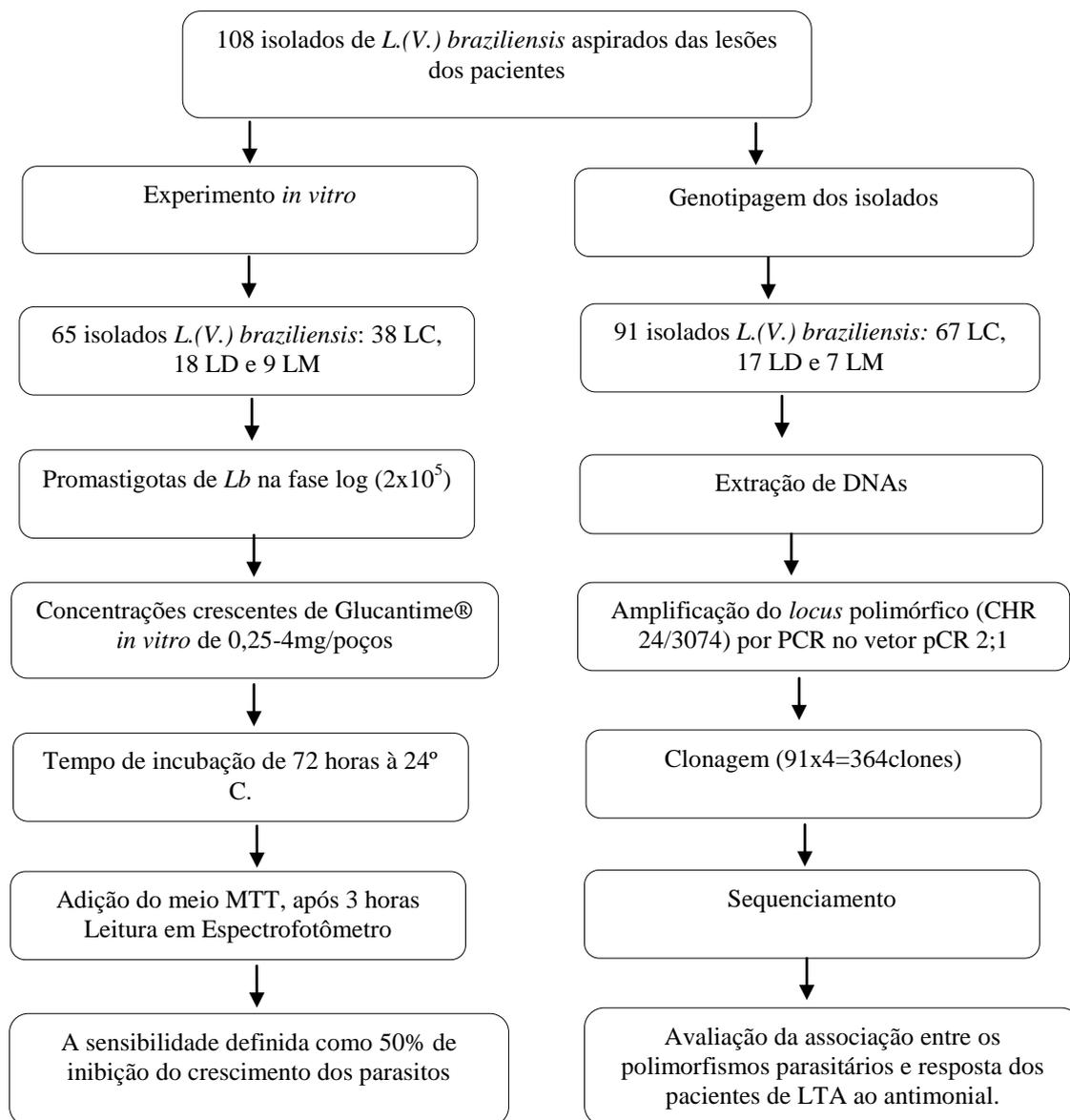
VII.13 Avaliação da susceptibilidade de promastigotas de *L.(V.) braziliensis* ao antimonial pentavalente Glucantime® *in vitro*

As amostras de *L.(V.) braziliensis* isoladas de pacientes de LC, LD e LM de CP foram descongeladas e as promastigotas de parasitos aspirados de lesões de pacientes, refratários ou responsivos ao antimônio, foram cultivados a 24°C em 400 ml de meio 199 (Gibco), pH 7,4, suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, Gibco), HEPES 40mM, hemina 0,005%, adenina 0,1mM (Sigma), e urina humana masculina a 2% (Zauli-Nascimento *et al* 2010).

O teste de susceptibilidade *in vitro* foi modificado a partir do método descrito por Zauli-Nascimento e colaboradores em 2010. Ao alcançarem a fase logarítmica de crescimento, as promastigotas de *L.(V.) braziliensis* foram coletadas, centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos, a 4°C e ressuspensas em 1ml do meio suplementado 199 na concentração de 1×10^7 células /ml. As promastigotas de leishmanias foram diluídas, adicionando-se 690µl do meio a 10µl de suspensão de leishmanias, e contadas em câmara de Neubauer. 100 µl de uma suspensão contendo aproximadamente 2×10^5 promastigotas de leishmania foram adicionadas aos poços de uma placa de microtitulação, contendo quantidades crescentes do antimonial pentavalente Glucantime®, que variaram de 0,25mg a 4mg por poço (ou seja, ponto zero; 0,25mg; 0,50mg; 1mg; 2mg e 4mg). Os isolados dos pacientes na forma promastigotas foram

considerados susceptíveis ao tratamento *in vitro* até 2mg e resistentes àqueles isolados que apresentaram valores maiores ou iguais a 4mg, pois ao realizarmos uma padronização da curva até 16mg Glucantime® observamos que após 4mg os resultados não se alteravam, ou seja, não havia morte dos parasitos, sendo, portanto considerados como resistentes *in vitro*. Após o período de incubação de 72 horas a 24°C foram acrescentados 20µl de MTT [3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)2,5difenil bromo tetrazolium), diluído 1:50 em Tampão A (NaCl 116mM, KCl 5,4mM, Glucose 5,5mM, MOPS 10mM e MgSO₄ mM) para concentração de 5mg/ml, às suspensões que foram incubadas a 24°C por 3 hrs. O ensaio MTT é baseado na clivagem do sal tetrazolium em um produto corado denominado formazan, pelas desidrogenases mitocondriais da célula. O ensaio permite uma quantificação de células viáveis, por espectrofotometria. A reação foi interrompida adicionando-se 40µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% em cada poço. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a um comprimento de onda de 540nm. O teste foi realizado com todos os 65 isolados de *L.(V) braziliensis* da área endêmica de Corte de Pedra. Os experimentos foram realizados em duplicata com a presença de isolados controle (positivo e negativo) para certifica-se da eficácia do experimento.

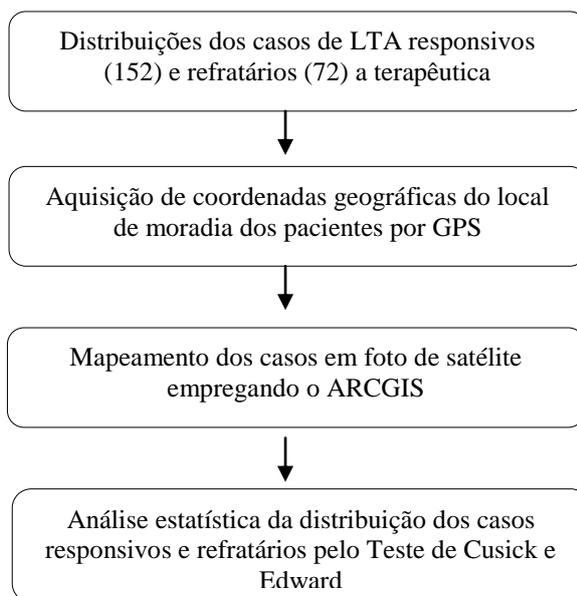
FLUXOGRAMA



VII.14 Distribuição geográfica dos casos de LTA responsivos e refratários a terapêutica em CP

As distribuições dos casos de LTA refratários e responsivos ao antimônio na área endêmica de Corte de Pedra foram determinadas pela aquisição de coordenadas geográficas por GPS, usando-se o equipamento Brunton multi-navegador (The Brunton Co., WY/USA), por pesquisadores de campo da nossa equipe. Este aparelho permite uma precisão de 15 metros nas medições. Uma vez que a maioria dos residentes dessa área rural mora e trabalha em fazendas, bem como devido ao fato da doença frequentemente ser transmitida no peri domicílio ou em plantações próximas às moradias, os locais de moradia foram usados como fontes primárias de coordenadas geográficas analisadas como padrão. Para a disposição dos casos de LTA mapeados em foto de satélite de CP foi empregado o sistema de informação geográfica ARCGIS 10 da ETRI INC.

FLUXOGRAMA



VII.15 Análises Estatísticas

Para avaliação epidemiológica foi utilizado um estudo de caso – controle dentro de uma coorte prospectiva realizada em CP no período de 2008 a 2011. Foram considerados casos os pacientes refratários e os controles os pacientes responsivos ao tratamento com antimonial Glucantime®.

As diferenças de distribuição dos diferentes genótipos de *Lb* entre os casos e os controles, bem como, as comparações das avaliações *in vitro* foram analisadas pelo Teste Exato de Fisher, e o risco relativo calculado com nível de confiança de 95%.

As comparações foram consideradas significativas para um $P \leq 0,05$.

Para a comparação das distribuições de casos e controles em Corte de Pedra foi empregado o geostatístico de teste Cusick e Edward (Cluster-Seer da BioMedware). Esse teste compara a distribuição de dois grupos de eventos geográficos na área estudada. Um valor significativo é obtido quando os eventos não se distribuem de forma similar na área alvo. Nos mapeamentos de casos e controles para inspeção visual em foto de satélite da região foi utilizado o sistema de informação geográfica ARCGIS 10 da ESRI INC, sendo considerado significativo para um $P \leq 0,02$.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Avaliação da susceptibilidade de promastigotas de *L.(V.) braziliensis* ao antimonial pentavalente Glucantime®, *in vitro*.

Os isolados de *L.(V.) braziliensis* empregados neste estudo foram obtidos da região de CP. Definiu-se como casos refratários os pacientes que apresentaram insucesso após dois cursos do tratamento com antimonial (Glucantime®) isoladamente ou em associação com pentoxifilina, e pacientes respondedores os que apresentaram resposta satisfatória até dois cursos com antimonial.

A droga utilizada para o teste de susceptibilidade *in vitro* das promastigotas de *L.(V.) braziliensis* foi antimoniato de N-metil glucamina (antimoniato de meglumina), o Glucantime®, disponibilizada pelo Ministério da Saúde. Os ensaios experimentais se basearam na avaliação da inibição do crescimento dos parasitos.

As concentrações de antimonial testadas *in vitro* variaram de 0,25mg a 4mg. As promastigotas sensíveis a até 2mg foram consideradas susceptíveis ao Glucantime®, ao passo que aquelas que resistiram doses até 4mg foram consideradas resistentes ao tratamento *in vitro*. Dezesesseis (41%) isolados de *L.(V.) braziliensis* provenientes de pacientes respondedores ao tratamento com Glucantime® se mostraram susceptíveis à droga *in vitro*, ao passo que vinte e três (59%) se mostraram resistentes ao tratamento *in vitro*. Dos isolados de *L.(V.) braziliensis* provenientes de pacientes refratários à droga, quinze (57,7%) se mostraram susceptíveis à droga *in vitro*, ao passo que onze (42,3%) se mostraram resistentes ao tratamento *in vitro*. Não houve diferença significativa quanto

às proporções de isolados susceptíveis e resistentes ao Glucantime® *in vitro* entre os pacientes respondedores e refratários ao tratamento ($p=0,21$) (Tabela 1).

Comparando-se a susceptibilidade ao antimonial *in vitro* entre *L.(V) braziliensis* isoladas de casos LC e LD, observou-se que vinte e cinco (66%) isolados de *L.(V) braziliensis* provenientes de pacientes com LC se mostraram susceptíveis à droga, ao passo que treze (34%) se mostraram resistentes (Tabela 2). Dos isolados de *L.(V) braziliensis* provenientes de pacientes com LD, quatro (22%) se mostraram susceptíveis à droga *in vitro*, ao passo que quatorze (78%) se mostraram resistentes. Os resultados apresentaram uma diferença bastante significativa ($p=0,004$) (Tabela 2).

Quando comparamos a susceptibilidade ao antimonial *in vitro* entre *L.(V) braziliensis* isoladas de casos de LC e LM. Observamos que dois (22%) isolados de *L.(V) braziliensis* de pacientes com LM se mostraram susceptíveis à droga, ao passo que sete (78%) se mostraram resistentes (Tabela 3). A forma cutânea já foi descrita acima. Os resultados apresentaram uma diferença significativa ($p= 0,02$). (Tabela 3). Assim os dados mostram uma maior resistência *in vitro* dos parasitos provenientes das formas disseminada e mucosa em relação à forma cutânea.

Tabela 1. Comparação das respostas ao Glucantime, *in vitro*, de promastigotas de *L.(V.) braziliensis* isoladas de casos de LTA responsivos e refratários ao antimonial acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra - Ba entre 2008 e 2011.

Resposta terapêutica do paciente ao Glucantime®	Concentrações de antimonial <i>in vitro</i>		Total
	0,25 a 2mg (Susceptíveis)	4mg (Resistentes)	
Responsivo	16	23	39
Refratário	15	11	26

*p>0,05, Teste Exato de Fisher

Tabela 2. Comparação das respostas ao Glucantime, *in vitro*, de promastigotas de *L.(V.) braziliensis* isoladas de casos de LC e LD acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra – Ba entre 2008 e 2011.

Forma clínica de LTA	Concentrações de antimonial <i>in vitro</i>		Total
	0,25 a 2mg (Susceptíveis)	4mg (Resistentes)	
Leishmaniose Cutânea	25	13	38
Leishmaniose Disseminada	04	14	18

*p=0,004, Teste Exato de Fisher

Tabela 3: Comparação das respostas ao Glucantime, *in vitro*, de promastigotas *L.(V.) braziliensis* isoladas de casos de LC e LM acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra – Ba entre 2008 e 2011.

Forma clínica de LTA	Concentrações de antimonial <i>in vitro</i>		Total
	0,25 a 2mg (Susceptíveis)	4mg (Resistentes)	
Leishmaniose Cutânea		13	38
Leishmaniose Mucosa	02	07	09

*p=0,02, Teste Exato de Fisher

VIII.2 Distribuição geográfica dos casos de LTA refratários e responsivos ao tratamento com antimonial em CP.

A distribuição geográfica dos casos de LTA responsivos e refratários à terapêutica acompanhados entre 2008 e 2011 no Posto de Saúde de Corte de Pedra está disposta na figura 1. O teste de Cusick e Edward para a comparação estatística entre locais de residência de respondedores e refratários ao Glucantime® não mostrou uma diferença significativa entre os grupos para um $p=0,02$. A observação mais importante que resulta do mapeamento é que a refratariedade ao antimonial se encontra dispersa por toda a área endêmica para LTA de forma quase semelhante.

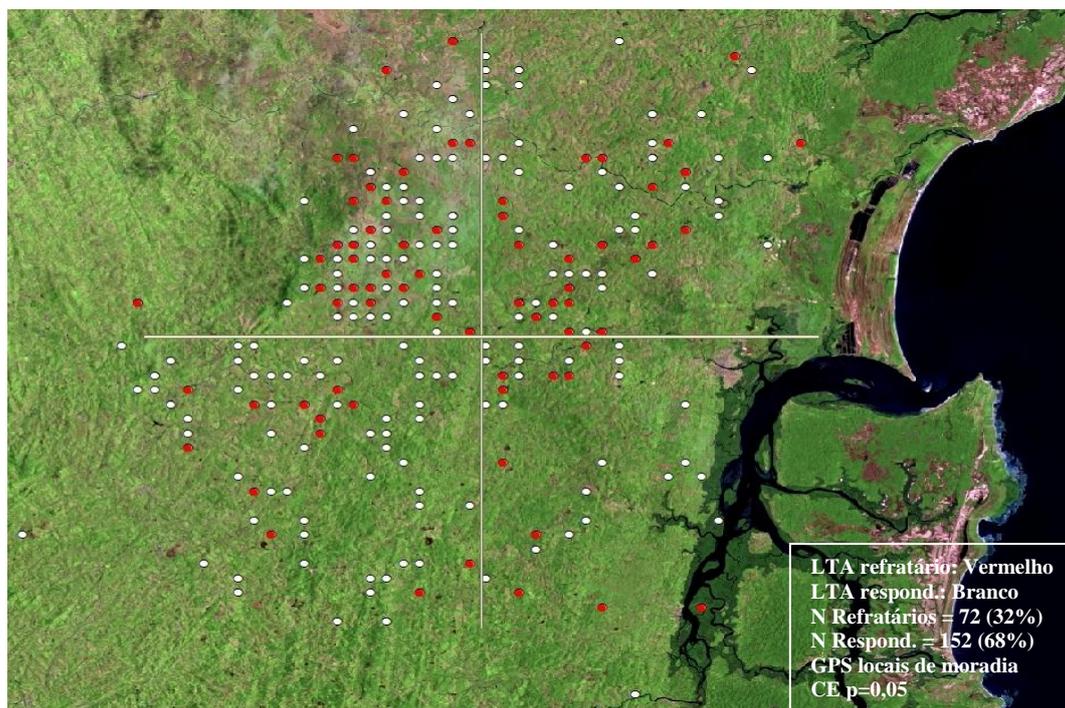


Figura 1. Foto por satélite da distribuição dos casos de LTA refratários e responsivos ao tratamento com antimonial em Corte de Pedra. Os pontos brancos indicam os casos responsivos e os pontos em vermelho os casos refratários.

VIII.3 Validação de polimorfismo no *locus* CHR 24/3074 e Avaliação de suas associações com desfecho terapêutico.

Em estudo prévio realizado pelo nosso grupo identificamos uma população multiclonal de *L. (V.) braziliensis* causadora de LTA em CP com clados parasitários associados a diferentes formas clínicas da doença (Schriefer *et al*, 2004). Neste estudo foram analisadas as sequências de fragmentos amplificados do genoma do parasito para identificar genótipos de *L.(V.) braziliensis* associados a desfechos terapêuticos. O *locus* CHR24/3074 foi sequenciado em 91 isolados de *L(V) braziliensis*, provenientes de sessenta e três pacientes responsivos e vinte e oito refratários à terapêutica antimonial na área endêmica de Corte de Pedra.

A identificação de polimorfismo no *locus* selecionado na população de *L.(V) braziliensis* de Corte de Pedra foi descrita anteriormente (Queiroz *et al*, 2012). A fim de validar esse polimorfismo no *locus* CHR24/3074 na amostra empregada neste estudo, um par de primers para amplificação específica desse *locus* por PCR foi desenhado, sendo complementares às sequências que flanqueiam as regiões polimórficas identificadas por Queiroz *et al*, 2012. Com estes primers, o *locus* CHR24/3074 foi reamplificado do DNA genômico dos isolados de *L. (V.) braziliensis*, produzindo amplicons com aproximadamente 800pb de comprimento. Os fragmentos amplificados foram clonados em pCR2.1, as sequências determinadas e os polimorfismos validados. A análise dos 91 isolados de *L. (V.) braziliensis* de diferentes desfechos terapêuticos revelou um total de 10 SNPs no *locus* CHR24/3074. Com base no número de amostras a partir das quais cada alelo foi identificado fomos capazes de determinar a frequência do alelo para cada posição polimórfica no cromossomo em nossa amostra (Tabela 4).

Conforme observado nesta tabela dez posições polimórficas foram detectadas no *locus*. No período correspondente a 2008-2011, surgiram quatro novas posições polimórficas no *locus* avaliado: 24/3636, 24/3729, 24/3824 e 24/3827. As demais, seis posições, já se mostraram polimórficas em amostra anterior (Queiroz *et al*, 2012). Para cada posição polimórfica, a predominância de um nucleotídeo pôde ser observada na amostra, com substituições ou indels ocorrendo em um subconjunto menor dos isolados. A estratégia de sequenciamento de amplicons clonados permitiu identificar, ainda, haplótipos de SNPs e indels no *locus* CHR24/3074. Foram identificados 05 haplótipos que puderam ser detectados em pelo menos 10% dos isolados de *L. (V.) braziliensis* da amostra (Tabela 5). Na análise estatística não encontramos associação significativa entre polimorfismos ou seus haplótipos e desfechos terapêuticos (Tabela 6).

Tabela 4. SNPs/Indels encontrados no *locus* CHR 24/3074 de *L. (V.) braziliensis* em CP e a frequência de seus alelos na amostra

<i>Locus</i> e polimorfismo	Posição no cromossomo	Alelos (frequência de cada alelo entre os isolados de <i>L.(V.) braziliensis</i> da amostra) ^a
SNP 24/3099ag ^b	3099	A/G (0,49/1)
SNP 24/3120ga ^b	3120	G/A (0,49/1)
SNP 24/3136at ^b	3136	T/A (0,5/1)
SNP 24/3197ag ^b	3197	A/G (0,5/1)
SNP 24/3537ct ^b	3537	C/T (0,51/1)
SNP 24/3636ct ^c	3636	C/T (0,30/1)
SNP 24/3672tc ^b	3672	T/C (0,50/1)

SNP 24/3729ac ^c	3729	A/C (0,17/1)
SNP 24/3824g- ^c	3824	Indel/G (0,29/1)
SNP 24/3827gc ^c	3827	G/C (0,32/1)

^a Frequência de isolados que apresentaram o alelo no *locus*.

^b SNPs presentes no *locus* CHR24/3074 de *L.(V.) braziliensis* no período de 1990-2007

^c SNPs encontrados no *locus* CHR24/3074 de *L.(V.) braziliensis* no período de 2008-2011

Tabela 5. Haplótipos de SNPs/ Indels no *locus* CHR 24/3074 encontrados em pelo menos 10% dos isolados de *L. (V.) braziliensis* de CP, estudados.

<i>Locus</i>	Haplótipos (frequência dos haplótipos entre os isolados de <i>L.(V.) braziliensis</i> da amostra)
CHR 24/3074	CGACATGAAG (0,13)
	CGCCATGAAG (0,13)
	CGCTCCATGA (0,32)
	CGCCCTGAAG (0,93)
	G-CCCTGAAG (0,19)

Tabela 6. Associação entre SNPs/Indels de *L.(V.) braziliensis* no locus CHR 24/3074

SNPs ^a	F ^b	RR	IC 95%	P ^c
24/3099ag	0,49	0,66	0,34 -1,25	0,26
24/3120ga	0,49	0,66	0,34 -1,25	0,26
24/3136at	0,50	0,63	0,33 – 1,19	0,17
24/3197ag	0,50	0,73	0,39 – 1,37	0,36
24/3537ct	0,51	0,81	0,43 – 1,50	0,64
24/3636ct	0,30	1,06	0,55 – 2,05	1,0
24/3672tc	0,50	0,85	0,45 – 1,57	0,65
24/3729ac	0,17	1,56	0,80 – 3,03	0,24
24/3824g-	0,29	0,94	0,47 – 1,88	1,0
24/3827gc	0,33	1,12	0,60 – 2,13	0,81

^a Presença de SNPs no *locus* estudado

^b Frequência no *locus* polimórfico

^c Valor de P calculado pelo Teste Exato de Fisher

IX. DISCUSSÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença parasitária que é endêmica na maioria dos países da América Latina. É caracterizada por um pleomorfismo clínico significativo, o que tem sido relacionado com a espécie infectante e com a resposta imune do hospedeiro (Silveira *et al*, 2004). O índice de falha terapêutica tem se elevado nos últimos anos, com aumento da concentração e duração da terapêutica o que sugere que estes parasitos estão passando por um processo de mutação com a presença de cepas resistentes aos antimoniais. O aparecimento de resistência tanto natural quanto adquirida aos antimoniais tem sido observado em várias partes do mundo. Na Índia, a resistência parece ser devido ao uso indiscriminado e descontínuo do fármaco muitas vezes em doses sub-terapêuticas. Em Bihar, região endêmica, cerca de 60% dos casos não são responsivos ao tratamento com Sb^V (Yardley *et al.*, 2006). Hadighi e colaboradores (2007) mostraram que existem cepas de *L.tropica* resistentes aos antimoniais e que estas cepas são sensíveis a outras drogas de segunda linha utilizadas no tratamento dos pacientes iranianos com LC. Nas Américas tem aumentado a preocupação quanto à refratariedade das formas de LC e LM ao tratamento (Llanos-Cuentas *et al*, 2008).

Este nosso estudo surgiu da observação de que um elevado número de pacientes em CP tem apresentado falhas ao tratamento com antimonial (Glucantime ®), e a necessidade de se verificar que a refratariedade está associada a fatores intrínsecos dos parasitos, ou relacionados ao hospedeiro como a sua carga genética, e resposta imune. As evidências de que a população de CP é multiclonal (Schriefer *et al*, 2004) sugere a existência de diferenças genóticas entre as cepas resistentes e susceptíveis ao

antimonial. Por fim, um estudo prévio realizado pelo nosso grupo mostrou que a *L.(V.) braziliensis* em CP ocorre através de pequenos surtos que se encontram disperso em toda área endêmica (Schriefer *et al*, 2009). Desta forma, seria provável, portanto, que as cepas recuperadas de pacientes refratários ou responsivos ao tratamento, supostamente, estariam agrupadas ou compartimentalizada em áreas distintas de CP.

Inicialmente, verificou-se a correlação entre a resposta ao antimonial, *in vivo* e *in vitro*. A hipótese era que, pacientes refratários ao tratamento estariam infectados por cepas não respondedoras ao antimonial, contudo isto não foi verificado. As possíveis explicações para a falta de associação entre as respostas *in vivo* e *in vitro* são: 1- O método utilizado para avaliar a resposta *in vitro* talvez não tenha sido o mais adequado. Sabemos que, a maioria dos estudos relatados é voltada a formas promastigotas, as quais são predominantes no vetor, sendo que o estudo com formas amastigotas seria clinicamente mais relevante, já que esta é a forma predominantemente infectante em humanos. 2- Fatores relacionados à resposta imune do hospedeiro pode ter um papel determinante na refratariedade ao antimonial.

Os parasitas do gênero *Leishmania* sintetizam esteróides específicos e indispensáveis para o crescimento e viabilidade celular, os quais são do tipo ergostanos (ergosterol). Existem algumas enzimas indispensáveis à síntese dos ergostanos, que podem ser inibidas ou reguladas por fármacos, como os composto azólicos (cetoconazol e itraconazol). Entretanto, a resposta clínica frente ao tratamento com essa classe de fármacos depende também do tipo de *Leishmania*. São vários os ensaios realizados para a avaliação da susceptibilidade de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp. a fármacos. Os estágios evolutivos do parasito apresentam diferenças bioquímicas.

O antimônio pentavalente (Sb^V) entra no macrófago e pode agir diretamente sobre a forma amastigota no vacúolo ou ser reduzido à forma trivalente (Sb^{III}) no citosol (Lira *et al.*, 1999). Os antimoniais pentavalentes (ou a forma ativa, trivalente) parecem interferir na produção de energia em amastigotas de *Leishmania*, inibindo tanto a glicólise como a oxidação de ácidos graxos (Rath *et al.*, 2003). Callahan *et al.* (1997) compararam os IC_{50} das amastigotas intracelulares e amastigotas axênicas de *L. mexicana* em relação a diferentes drogas. Os IC_{50} das amastigotas intracelulares e amastigotas axênicas diferiram em apenas um medicamento. Dados mostraram que a susceptibilidade das amastigotas axênicas às drogas é semelhante aos resultados obtidos a partir da avaliação dentro dos macrófagos. Estes resultados vão de encontro com a hipótese de que a resposta ao antimonial contra as formas amastigotas depende dos macrófagos. Já foi visto que a susceptibilidade de promastigotas de *Leishmania* à anfotericina B e Tamoxifeno é semelhante à susceptibilidade de amastigotas intracelulares (Sharieff *et al.*, 2006; Miguel *et al.*, 2007). Apesar de relatos na literatura que promastigotas de *Leishmania* são menos sensíveis ao antimônio pentavalente do que as amastigotas existem vários trabalhos com esse fármaco utilizando essa forma do parasita.

Para avaliação da susceptibilidade *in vitro*, foi utilizado o protocolo sugerido por Zauli-Nascimento *et al.* 2010, no qual verificou-se a resposta das promastigotas de *L.(V) braziliensis* ao antimonial.

Neste trabalho, as respostas *in vitro* das promastigotas de *L.(V) braziliensis* ao Glucantime® isoladas dos casos de leishmaniose cutânea foram comparadas com aquelas isoladas da forma disseminada e mucosa. A proporção de resistência dos

isolados *L.(V) braziliensis* de pacientes com leishmaniose mucosa e disseminada foram maiores do que aqueles observados entre os isolados de LC. Estes achados *in vitro*, refletem o observado na área endêmica de CP, sendo estas formas mais resistentes à terapêutica antimonial.

Embora as formas promastigotas não sejam o estágio clinicamente relevante para a avaliação *in vitro* e que as amastigotas intracelulares se correlacionam melhor com a resposta *in vivo*, sendo, portanto, as encontradas no hospedeiro vertebrado. Dados sugerem que a importância do estudo limitou-se pela forma promastigotas, mas Azeredo- Coutinho e colaboradores (2007) realizaram experimento com as promastigotas de *L.(V) braziliensis* isoladas dos pacientes de LTA no Rio de Janeiro, as quais foram expostas a concentrações crescentes de Glucantime® *in vitro* e comparadas com atividade dos isolados de outras espécies de *Leishmania*. Os resultados mostraram uma significativa correlação positiva entre as respostas *in vitro* ao antimonial das amastigotas e promastigotas, provenientes dos mesmos isolados clínicos de LTA.

A LD é uma forma de doença emergente em Corte de Pedra com crescente expansão geográfica e aumento do número de casos nas últimas décadas (Schriefer *et al*, 2009; Jirmanus *et al*, 2012). Entre os pacientes com LM, os índices de falha terapêutica são maiores que 40%, com recidiva da doença podendo ocorrer em cerca de 17% dos casos (Bacellar *et al*, 2002; Machado *et al*, 2007). Acredita-se que a resistência ao antimonial e recidiva da doença seja provavelmente devido à terapêutica irregulares e baixas doses do medicamento, o que resultaria no surgimento de cepas/isolados resistentes. Queiroz e colaboradores (2012) mostraram a existência de cepa de *L.(V) braziliensis* estatisticamente associada com a forma disseminada de leishmaniose.

Portanto, a partir desta observação, é provável que de fato estas cepas associadas à forma disseminada da doença também sejam mais resistentes aos antimoniais, se comparadas às cepas associadas à LC. Schriefer *et al*, 2004 utilizando o método de RAPD mostraram que o perfil genético da cepa infectante era estatisticamente associado as formas de doença. Kumar colaboradores (2012) avaliaram a expressão de oito genes nos isolados de *L. donovani* recuperados de pacientes responsivos e refratários a terapêutica. A maioria dos genes apresentou significativa expressão associada aos isolados resistentes ao antimonial em relação aos isolados sensíveis.

Hoje, é importante uma abordagem com a integração dos estudos de biologia molecular, genética evolutiva aplicados nas áreas de diagnóstico, tipagem de cepas, identificação de espécies, patogenicidade, resistência às drogas e vacinas, e especificidade a hospedeiros e vetores.

No presente estudo, as cepas recuperadas de pacientes refratários e responsivos ao tratamento foram genotipadas e não foram encontradas diferenças entre o perfil genético desses isolado. Este estudo aponta para a presença de cepas resistentes ao Glucantime® em CP. Existem drogas de segunda linha preconizadas pelo Ministério da Saúde, que são efetivas no tratamento de casos refratários ao Glucantime® (Pentamidina e Anfotericina B). Ensaio terapêuticos recentes evidenciaram que o uso de drogas alternativas, empregadas isoladamente ou em associação com o Glucantime®, são capazes de aumentar a responsividade ao tratamento da LTA. Sendo assim, a identificação de marcadores parasitários preditores de resposta ao Glucantime® permitiriam a introdução precoce dos esquemas de segunda linha ou alternativos naqueles indivíduos infectados com cepas pouco sensíveis ao antimonial pentavalente.

Embora não tenha encontrado uma associação entre genótipos e resposta terapêutica nossos dados reforçam para presença de cepas resistentes na área de CP conforme estudos realizados no local. Almeida e colaboradores (1999) mostraram que os pacientes com LC tratados com a combinação de GM-CSF com antimonial têm uma maior chance de estarem curados após 40 dias do término do tratamento do que aqueles tratados apenas com Glucantime®. Em outro estudo, 100% dos pacientes com LC tratados com a combinação de GM-CSF tópico e antimonial intravenoso apresentaram cura das lesões em um período de 60 dias, ao passo que entre os tratados, exclusivamente com Glucantime®, 50% se encontravam curados (Santos *et al*, 2004). Lessa e colaboradores (2001) e Machado e colaboradores (2007) mostraram que os pacientes LM refratários ao Glucantime® respondem bem a combinação com pentoxifilina e que o tratamento oral com miltefosina nos pacientes com LC apresentam uma melhor resposta terapêutica em relação ao Glucantime® (Machado *et al*, 2010).

A evidência de pacientes com LD e LM (menos responsivos a terapêutica) apresenta um número maior de cepas resistentes ao antimonial, o que mostra que a falta de associação entre os genótipos e a resposta terapêutica, seja devido ao baixo poder discriminatório da ferramenta utilizada. Queiroz e colaboradores (2012) mostraram que polimorfismos identificados em seis *loci* diferentes eram estatisticamente associados com a forma disseminada da doença.

No presente estudo, a aplicação de apenas um único *locus*, CHR24/3074, na genotipagem das cepas de pacientes refratários e responsivos a terapêutica provavelmente limitou a capacidade discriminatória da técnica utilizada na presente avaliação. Futuros estudos utilizando os demais *loci* (cinco), sozinhos ou combinados

talvez permita encontrar diferença entre cepas recuperadas dos pacientes refratários ou responsivos ao tratamento. Outra possibilidade é que a cepa não tenha um papel relevante na resposta ao antimonial. Neste caso, a refratariedade ao tratamento poderia ser atribuída ao hospedeiro e/ou gravidade da doença. É provável que os pacientes que desenvolveram as formas mais graves (LD, LM e com maior refratariedade ao tratamento) não respondam ao tratamento apenas devido ao elevado grau de gravidade da doença. Por fim, avaliou-se a distribuição dos casos refratários e responsivos a terapêutica na área endêmica de CP. A nossa hipótese era que os pacientes refratários ao tratamento apresentariam distribuição geográfica diferentes dos pacientes responsivos, e/ou uma compartimentalização dos casos refratários. Conforme análise observou-se que: 1- não houve diferença na distribuição dos casos refratários e responsivos ao tratamento; 2- os casos refratários apresentaram uma ampla distribuição na área endêmica de CP. Supondo que as cepas tivessem um papel determinante na refratariedade ao antimonial, esperava-se que os pacientes supostamente infectados pelas cepas resistentes a esta droga estariam mais concentrados em uma determinada região da área endêmica ou formando grupos ou dispersos em toda área. Uma possível explicação para a ampla distribuição dos pacientes refratários é que as cepas associadas a estes casos estariam presentes na área endêmica a tempo suficiente para que elas pudessem alcançar uma ampla dispersão em CP.

Por fim sabemos que a cura da leishmaniose depende não apenas de um fator mais de vários fatores como o sistema imune do hospedeiro, a forma clínica da doença, a cepa do parasito e a droga utilizada. Devido às dificuldades de controlar as leishmanioses, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos de busca de novas

drogas mais eficazes, devido a isto é de grande importância estudos sobre a avaliação *in vivo* e *in vitro* da sensibilidade dos parasitas as drogas usadas mais comumente no Brasil e principalmente na Bahia.

X. CONCLUSÃO

Os dados deste estudo indicam que exista uma maior resistência ao antimonial em parasitos provenientes de determinadas formas clínicas observados em Corte de Pedra, a saber, LM e LD. Portanto, sugere uma possível associação entre cepa de *L.(V.) braziliensis* e resposta terapêutica.

No mapeamento encontramos uma ampla distribuição de casos refratários ao Glucantime® por toda área de Corte de Pedra, embora não tenhamos conseguido detectar associação entre genótipo de *L.(V.) braziliensis* e resposta terapêutica nesses pacientes de LTA. A análise de um único *locus* na genotipagem certamente limitou nosso poder discriminatório. Futuros estudos avaliarão melhor essa associação empregando, mais *loci* polimórficos entre a *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra.

REFERÊNCIAS

Almeida R., D'Oliveira Junior A., Machado P., Bacellar O., Ko A.I., Jesus de A.R., Mobashery N., Santos J.B., Carvalho E.M. *Randomized, Double-Blind Study of Stibogluconate Plus Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor versus Stibogluconate Alone in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 180:1735–7. 1999.

_____, Brito J.S., Machado P.R. *Imunoterapia da Leishmaniose Tegumentar Americana*. *Gazeta Médica da Bahia*, 75(1) 83-91. 2005.

Alves W.A., De Sena J.M.; Gomes M. L. de S., Elkhoury A.N.M. *Leishmaniose: situação atual no Brasil*. Ministério da Saúde, 2008.

Arevalo J., Ramirez L., Adai V., Zimic M., Tulliano G., Miranda-Verástegui C., Lazo M., Loayza-Muro R., De Doncker S., Maurer A., Chappuis F., Dujardin J.C., Llanos-Cuentas A. *Influence of Leishmania (Viannia) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis*. *J Infect Dis* 195, 1846-1851. 2007.

Azeredo-Coutinho R.B., Mendonça S.C., Callahan H., Portal A.C., Grogl M. *Sensitivity of Leishmania braziliensis promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other Leishmania species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis*. *J Parasitol* 93, 688-693. 2007.

Bacellar O., Lessa H., Schriefer A, Machado P., De Jesus A.R., Dutra W.O., Gollob K.J., Carvalho E.M. *Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients*. *Infection and Immunity*, p. 6734–6740. 2002.

Banuls A.L., Hide M., Tibayrenc M. *Molecular epidemiology and evolutionary genetics of Leishmania parasites*. *International Journal for Parasitology* 29, 1137-1147, 1999.

_____. *Population genetics: Evolutionary genetics and molecular diagnosis of Leishmania species*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 96, 2002.

Bates P.A. *Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies*. International Journal for Parasitology, 1097–1106. 2007.

Berman J.D., Waddell D, Hanson B.D. *Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate*. Antimicrob Agents Chemother; 27: 916–920. 1985.

_____, Gallalee J.V., BEST JM. *Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta -oxidation in Leishmania mexicana amastigotes*. Biochem Pharmacol; 36:197–201. 1987.

Callahan H.L., Portal A.C., Devereaux R., Grogl M. *An Axenic Amastigote System for Drug Screening*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol.41, p. 818- 822. 1997.

Costa J.M.L. *Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil*. Gaz. méd. Bahia, 75:1, 3-17. 2005.

Croft S.L., Coombs G.H. *Leishmaniasis– current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs*. TRENDS in Parasitology, Vol.19, No.11. 2003.

_____, Sundar S., Fairlamb A.H. *Drug Resistance in Leishmaniasis*. Clinical Microbiology Reviews, p. 111–126. 2006.

Cupolillo E., Brahim L.R., Toaldo C.B., De Oliveira-Neto M.P., De Brito M.E., Falqueto A., De Naiff M.F., Grimaldi Junior M. *Genetic polymorphism and molecular epidemiology of Leishmania (Viannia) braziliensis from different hosts and geographic areas in Brazil*. J. Clin. Microbiol. 41: 3126-3132. 2003.

De Lima E.B., Porto C., Da Motta J.O.C., Sampaio R.N.R. *Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana Treatment of American cutaneous leishmaniasis*. An Bras Dermatol; 82(2): 111-24. 2007.

De Paula C.D.R., Sampaio J.H.D., Cardoso D.R., Sampaio R. N. R. *Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36(3): 365-371. 2003.

Deps P.D., Viana M.C., Falqueto A., Dietze R. *Avaliação comparativa da eficácia e toxicidade do antimoniato de N-metil-glucamina e do Estibogluconato de Sódio BP88® no tratamento da leishmaniose cutânea localizada*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 33(6): 535-543. 2000.

Desjeux P. *Leishmaniasis; Public Health Aspects and Control*. Elsevier Science Inc. 1996.

_____. *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases , 305–318. 2004.

Enright M, Spratt B.G. *A multilocus sequence typing scheme for Streptococcus pneumoniae: identification of clones associated with serious invasive disease*. Microbiology; 144: 3049-60. 1998.

_____, Day N.P, Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G. *Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol; 38:1008-15. 2000.

Feil E., Zhou J., Maynard S.J., Spratt B.G. *A comparison of the nucleotide sequences of the adk and recA genes of pathogenic and commensal Neisseria species: evidence for extensive interspecies recombination within adk*. J Mol Evol; 43:631-40. 1996.

Gontijo B., De Carvalho M.L.R. *Leishmaniose tegumentar americana*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 36(1):71-80. 2003.

Gontijo C.M.F., Melo M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v.7, n.3, p. 338-349, 2004.

Goto H., Lindoso J.A.L. *Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis*. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 8(4), 419–433. 2010.

Grimaldi Junior G., Tesh R.B. *Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research*. *Clinical Microbiology Reviews*, p.230-250. 1993.

Guimarães L.H., Machado P.R.L., Lago E.L., Morgan D.J., Schriefer A., Bacellar O., Carvalho E.M. *Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of Leishmania braziliensis in the state of Bahia, Brazil*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103(7): 712–715. 2009.

Hadighi R., Mohebbi M., Boucher P., Hajjaran H., Khamesipour A., Ouellette M. *Unresponsiveness to glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant Leishmania tropica parasites*. *PLOS Medicine*, 3: 659-667. 2006.

_____, Boucher P., Khamesipour A., Meamar A.R., Roy G., Ouellette M., Mohebbi M. *Glucantime-resistant Leishmania tropica isolated from Iranian patients with cutaneous leishmaniasis are sensitive to alternative antileishmania drugs*. *Parasitol Res.* 101, 1319-1322. 2007

Jirmanus L., Glesby M.J., Guimarães L.H., Lago E., Rosa M.E., Machado P.M., Carvalho E.M. *Epidemiological and Clinical Changes in American Tegumentary Leishmaniasis in an Area of Leishmania (Viannia) braziliensis Transmission Over a 20-Year Period*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 86(3), pp.426-433. 2012.

Kumar D., Singh R., Bhandari V., Kulshrestha A., Negi N.S., Salotra P. *Biomarkers of antimony resistance: need for expression. Analysis of multiple genes to distinguish resistance phenotype in clinical isolates of Leishmania donovani*. *Parasitol. Res.*, 111:223-230. 2012.

Lainson R., Shaw L.L., Silveira F.T., De Sousa A.A.A., Braga R.R., Ishikawa E. *The Dermal Leishmaniasis of Brazil, with Special Reference to the Eco-epidemiology of the Disease in Amazonia*. Mem. Inst.Oswaldo Cruz, vol. 89(3):435-443.1994.

Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E.G., Deroux G., Grain J., Ronigberg B.M., Liedale G.F., Leoblich A.R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vávra J., Wallace F.G. *A newly revised classification of the Protozoa*. Journal of Protozoology, 27: 37-58, 1980.

Llanos-Cuentas A., Tulliano G., Araujo-Castillo R., Miranda-Verastegui C., Santamaria-Castrellon G., Ramirez L., Lazo M., De Doncker S., Boelaert M., Robays J., Dujardin J.C., Arevalo J., Chappuis F. *Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru*. Clin Infect Dis 46: 223-231. 2008.

Lira R., Sundar S., Makharia A., Kenney R., Gam A., Saraiva E., Sacks D. *Evidence that the High Incidence of Treatment Failures in Indian Kala-Azar is due to the Emergence of Antimony-Resistant Strains of Leishmania donovani*. The Journal of Infectious Diseases, 180:564–7. 1999.

Machado P.R.L., Lessa H., Lessa M., Guimarães L.H., Bang H., Ho J.L., CARVALHO E.M. *Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: A randomized trial for mucosal leishmaniasis*. Clinical Infectious Diseases, 44:788–93. 2007.

_____, Ampuero J., Guimarães L.H., Villasboas L., Rocha A.T., Schriefer A., Sousa R.S., Talhari A., Penna G., Carvalho E.M. *Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania braziliensis in Brazil: A Randomized and Controlled Trial*. Plos Neglected Tropical Diseases, v.4, issue 12. 2010.

_____, Carvalho E.M., Riley L.W., Wilson M.E., Schriefer A. *Association between an Emerging Disseminated form of Leishmaniasis and Leishmania (Viannia) braziliensis Strain Polymorphisms*. Journal of Clinical Microbiology, 50(12):4028.

2012.

_____, Rosa M.E.; Costa D., Mignac M., Silva J.S., Schriefer A., Teixeira M.M., Bacellar O., Carvalho E.M. *Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 105(8):438-44. 2011.

Maiden M.C. J., Bygraves J.A., Feil E. , Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhan Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B. G. *Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganism*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 95, pp. 3140–3145, Microbiology. March 1998.

Medeiros A.C.R., Roselino A.M.F. *Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje*. An. bras. Dermatol, 74(4): 329-326. 1999.

MS, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: Diagnostico Clínico e Diferencial. 2006.

_____. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2ª edição. Brasília, 2007.

_____. Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561. Acessado em: 13/11/2012.

Ouellette M., Drummelsmith J., Papadopoulou B. *Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments*. Drug Resistance Updates, 257–266. 2004.

Pearson R.D., Sousa de A.Q. *Clinical Spectrum of Leishmaniasis*. Clinical Infectious Diseases, 22:1-13. 1996.

Peter, W. The treatment of kala-azar: new approach to an old problem. Ind. J. Med.

Res. V.73, p. 1-18. 1981.

Pinheiro R.O. *Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia*. Infarma, v.16, nº 7-8. 2004.

Queiroz A., Sousa R., Heine C., Cardoso M., Guimarães L.H., Machado P.R.L., Carvalho E.M., Riley L.W., Wilson M.E., Schriefer A. *Association between an Emerging Disseminated form of Leishmaniasis and Leishmania (Viannia) braziliensis Strain Polymorphisms*. *J. Clin. Microbiol.* 50(12):4028. 2012.

Rath S., Trivelin L.A., Imbrunito T.R., Tomazela D.M., De Jesús M.N.E., Marzal P.C. *Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte*. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 4, 550-555. 2003.

Robledo S.M., Valencia A.Z., Saravia N.G. *Sensitivity to Glucantime of Leishmania viannia isolated from patients prior to treatment*. *Journal of Parasitology* **85**: 360–366. 1999.

Rodrigues A.M., Hueb M., Dos Santos T.A.R.R., Fontes C.J.F. *Fatores Associados ao Insucesso do Tratamento da Leishmaniose Cutânea com Antimoniato de Meglumina*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39 (2):139-145. 2006.

Rojas R., Valderrama L., Valderrama M., Varona M.X., Ouellette M., Saravia N.G. *Resistance to Antimony and Treatment Failure in Human Leishmania (Viannia) Infection*. *The Journal of Infectious Diseases*; 193:1375–83. 2006.

Sadeghian G., Nilforoushzadeh M.A. *Effect of combination therapy with systemic glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis*. *International Journal of Dermatology*, 45 819–821. 2006

Sampaio R.N.R., Marsden P.D. *Tratamento da Forma Mucosa de Leishmaniose sem Resposta a Glucantime, com Anfotericina B Liposomal*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30(2): 125-128. 1997.

Santos J.B., De Jesus A.R., Machado P.R., Magalhães A., Salgado K., Carvalho E.M.,

Almeida R.P. *Antimony plus Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Applied Topically in Low Doses Enhances Healing of Cutaneous Leishmaniasis Ulcers: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study*. The Journal of Infectious Diseases, 190:1793–6. 2004.

Saravia N.G., Segura I., Holguin A.F., Santrich C., Valderrama L., Ocampo C. *Epidemiologic, Genetic, and Clinical Associations among Phenotypically Distinct Populations of Leishmania (Viannia) in Colombia*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 59(1), pp. 86–94. 1998.

Schriefer A., Schriefer A.L.F., Góes-neto A., Guimarães L.H., Carvalho L.P., Almeida R.P., Machado P.R., Lessa H.A., De Jesus A.R, Riley L.W., Carvalho E.M. *Multiclonal Leishmania braziliensis Population Structure and Its Clinical Implication in a Region of Endemic American Tegumentary Leishmaniasis (ATL)*. Infect. Immun. 72: 508-514. 2004.

_____, Guimarães L.H., Machado P.R.L., Lessa M., Lessa H.A., Lago E., Ritt G., Góes-neto A., Schriefer A.L.F., Riley L.W., Carvalho E.M. *Geographic Clustering of Leishmaniasis in Northeastern Brazil*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 12–16. 2009.

Sharief A.H., Gasim K.E.A., Theander T.G., Kharazmi A., Omer S.A., Ibrahim M.E. *Leishmania donovani: an in vitro study of antimony-resistant amphotericin B sensitive isolates*. Exp. Parasitol., V. 114, n.4., p.247-252. 2006.

Silveira F.T, Lainson R., Corbett C.E.P. *Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 99(3): 239-251, May 2004.

Smith N.H., Holmes E.C., Donovan G.M, Carpenter G.A., Spratt B.G. *Networks and groups within the genus Neisseria: analysis of argF, recA, rho, and 16S rRNA sequences from human Neisseria species*. Mol Biol Evol; 16:773-83. 1999.

Simpson, L. *The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution*. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:363-382. 1987.

Soto-Mancipe J., Grogl M., Berman J. *Evaluation of pentamidine for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia*. *Clinic. Infect. Dis.*, v.16, n.3, p.417-425. 1993.

Stiles J.K., Hicock P.I., Shah P.H., Meade J.C. *Genomic Organization, transcription, splicing and gene regulation in Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol*, n.8, v.93, p.781-807.1999.

Sundar S., More D.K., Singh M.K., Singh V.P., Sharma S., Makharia A., KUMAR P.C. K., Murray H.W. *Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India: Report from the Center of the Indian Epidemic*. *Clinical Infectious Diseases*; 31:1104–7. 2000.

Tibayrenc M., Kjellberg F., Ayala F.J. *A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of Entamoeba, Giardia, Leishmania, Naegleria, Plasmodium, Trichomonas, and Trypanosoma and their medical and taxonomical consequence*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 87, pp. 2414-2418, April 1990.

_____, Arnaud J., Oury B., Brenipre S. F., Dardi M.L., Ayala F. J. *Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 88, pp. 5129-5133, June 1991.

_____, Neubauer K., Barnabo C., Guerrini F., Skarecky D., Ayala F.J. *Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 90, pp. 1335-1339, February 1993.

Turetz M.L., Machado P.R., Ko A.I., Alves F., Bittencourt A., Almeida R.P., Mobashery N., Johnson Junior W.D, Carvalho E. M. *Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil*. *The Journal of Infectious Diseases*, 186:1829–34. 2002.

Vázquez J. A., Berrón S. *Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 22(2):113-20. 2004.

Zauli-Nascimento R.G., Miguel D.C., YOkoyama-Yasunaka J.K.U., Pereira L.I.A., De Oliveira M.A.P., Ribeiro-Dias F., Dorta M.L., Uliana S.R.B. *In vitro sensitivity of Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) amazonensis Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B*. *Tropical Medicine and International Health*, vol. 15, pp 68-76. 2010.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Projeto: *Avaliação do papel do polimorfismo de cepas de Leishmania (V) braziliensis sobre a refratariedade ao tratamento com antimonial pentavalente.*

Objetivo do Projeto: Avaliar se existe associação entre os genótipos e os isolados da *L.(V.) braziliensis* provenientes de formas distintas de LTA e as respostas ao tratamento *in vivo* (respostas do pacientes) e *in vitro*.

Nome do paciente:

Investigador Principal: Albert Schriefer, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.

Comitê de Ética: Maternidade Climério de Oliveira/UFBA-Rua Padre Feijó 240, Ambulatório Magalhães Neto, 3^o andar, Canela-Salvador-Bahia.

Nº do Projeto:

Convite e Objetivo:

Você é convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm diferentes formas de leishmaniose. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você será solicitado (a) assinar este formulário de consentimento.

Participação voluntária: A sua participação é voluntária. Você pode decidir não participar do estudo em qualquer momento, sem perder os benefícios dos cuidados médicos prestados e de seu tratamento. Caso, após aceite participar, resolva descontinuar sua participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá o medicamento utilizado para o tratamento da leishmaniose (Glucantime®).

Finalidade do estudo: Este estudo vai estudar se as leishmanias causadoras das diferentes formas de leishmaniose são iguais ou diferentes. Para isto obteremos as

leishmanias responsáveis por sua doença em material da ferida, pela retirada de um pequeno pedaço da sua pele e por aspiração da borda da ferida.

Procedimentos: Caso você concorde em participar do estudo, os procedimentos para obtenção das leishmanias serão os mesmos realizados para o diagnóstico normal em doentes não participantes do estudo. Ou seja, além de ser examinado por um médico clínico, será realizada biópsia e aspirado da lesão, bem como teste intradérmico, e tirados 5 ml de sangue para sorologia, métodos que são necessários para o diagnóstico da doença. A retirada do pedaço da pele ou da ferida do nariz para diagnóstico da sua doença será feita com anestesia para você não sentir dor. Uma parte deste material de biópsia e do material de aspirado será usada para o diagnóstico e a outra para os estudos sobre a leishmania. Caso o diagnóstico de leishmaniose não seja confirmado, todo o material obtido para a pesquisa será destruído.

Análise do material biológico. Uma parte do material coletado durante a biópsia e a aspiração feitas em sua ferida servirá para o estudo da leishmania. Serão empregados dois testes com o objetivo de caracterizar geneticamente a leishmania que está causando a sua doença e depois compará-la com as leishmanias que estão causando doença nas outras pessoas desta região. Para um dos testes, o RAPD (DNA polimórfico randomicamente amplificado) o aspirado e a biópsia triturada serão colocados num líquido especial que permite o crescimento da leishmania. Depois da leishmania crescida, ou seja, multiplicada, será extraído o DNA dela. É este DNA que será

caracterizado pelo RAPD. O resultado desta caracterização se chama genótipo. Finalmente, os genótipos das leishmanias de outros pacientes desta região serão comparados com o genótipo da que está causando a sua doença. O outro teste se chama MLST (Tipagem de loci baseada em sequenciamento). Ele também tem como objetivo identificar os genótipos das leishmanias. No MLST não é necessário crescer a leishmania antes de se fazer o teste, ele pode ser realizado diretamente na biópsia e no aspirado. O RAPD e o MLST serão realizados em conjunto com o objetivo de confirmar os resultados e também de torná-los mais precisos.

Duração do estudo: Após a assinatura do termo de consentimento e confirmação do diagnóstico sua participação no estudo acabará em 2 ou 3 dias. Todo mês você será examinado para determinar a cura da doença ou necessidade de utilização de nova série de Glucantime® ou de outra medicação, que também lhe será fornecida gratuitamente. Isto não faz parte do estudo.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica. Você ou qualquer participante desse estudo não será identificado por nome nas publicações dos resultados do estudo.

Análises de riscos e benefícios: O tratamento que você receberá (Glucantime®) é semelhante ao que todos os pacientes receberão, participando ou não do estudo. Não

existe nenhum procedimento adicional para os participantes do estudo, assim não existe também nenhum risco adicional para você. De qualquer forma o risco de hemorragia ou infecção durante as biópsias e aspirados de lesão serão minimizados pela limpeza extensa da superfície mucosa ou cutânea das lesões com anti-sépticos antes dos procedimentos, pelo uso de instrumentos e materiais estéreis, e aplicando-se pressão com gaze nos locais onde foram realizados os procedimentos para estancar o sangramento. Materiais descartáveis serão usados em todos os procedimentos. O risco de reflexo vago-vagal será minimizado realizando-se os procedimentos com você deitado. Você também deverá se alimentar antes do procedimento para evitar tonturas ou perda transitória da consciência por causa do reflexo vago-vagal. Também será reservado um leito que você poderá usar para repousar e se recuperar caso sinta tonturas durante os procedimentos. Quaisquer reações adversas que você apresente devido ao teste cutâneo de Montenegro serão tratadas com pomadas anti-inflamatórias de corticosteróides (hidrocortisona 1%) no momento da leitura do exame (48 a 72 horas após a aplicação). Em caso de reação adversa ao teste de Montenegro você também receberá pomada adicional para que em casa você possa passá-la na pele, no local do teste três vezes ao dia por 3 a 5 dias, conforme necessário.

Retorno de benefícios para o sujeito e para a sociedade: Pode não haver qualquer benefício pessoal para você, como consequência de sua participação neste estudo. Contudo, nós esperamos que, no futuro, a sociedade possa se beneficiar deste estudo por ele resultar numa melhor compreensão desta doença parasitária freqüente, que poderá, inclusive, ajudar no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento.

Custos: Você não terá custos com o tratamento com antimônio ou com outra droga para tratamento da leishmaniose caso haja necessidade de uso. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

Esclarecimentos: Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contatar um dos seguintes investigadores pelo telefone (71) 3237-7353: Dr. Albert Schriefer, Dr. Edgar M. Carvalho, Dr. Paulo Machado e Dr. Luiz Henrique Guimarães. Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgar Santos, através do endereço que encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone (71) 3247-4634.

***Consentimento:** Eu li ou leram para mim as informações deste termo de consentimento livre e esclarecido acima. O Dr. Schriefer ou um representante dele explicou o estudo para mim e respondeu a todas as minhas dúvidas. Foram-me listados também os riscos e incômodos a que serei submetido, bem como os possíveis benefícios gerados por este estudo.*

Também me foi dito que eu não tenho que tomar parte deste estudo e que eu posso me recusar a participar a qualquer momento.

A equipe médica do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos estará disponível para quaisquer cuidados médicos que se mostrem necessários devido a injúrias resultantes da minha participação neste estudo. Além do mais, o Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, ou o patrocinador do estudo, cobrirá quaisquer despesas resultantes de cuidados médicos relativos à minha participação neste estudo.

Os meus direitos como participante da pesquisa me foram esclarecidos e eu, voluntariamente, consinto na minha participação no estudo. Foram-me esclarecidos o estudo e as razões de sua realização. Eu receberei uma cópia assinada deste termo de consentimento livre e esclarecido para arquivar, como documentação da minha participação como voluntário neste estudo.

Assinatura ou impressão do participante

Data

Assinatura ou impressão do responsável* / Data

Nome do responsável*

Assinatura ou impressão da testemunha / Data

Nome da testemunha

*Requerido apenas se o participante não for competente para tomar decisões.

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

Eu discuti os pontos acima com o participante do estudo ou seu representante legal. É da minha opinião que o participante entende os riscos, benefícios e obrigações envolvidos em sua participação neste projeto de pesquisa.

Assinatura do investigador