



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



**ASPECTOS CLÍNICOS, IMUNOLÓGICOS E TERAPÊUTICOS DA**  
**LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM IDOSOS.**

**ALEXSANDRO SOUZA DO LAGO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**SALVADOR, BA**

**2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Souza do Lago, Aleksandro  
ASPECTOS CLÍNICOS, IMUNOLÓGICO E ASPECTO TERAPÊUTICO AO  
ANTIMONIAL PENTAVALENTE EM PACIENTES IDOSOS COM LEISHMANIOSE  
CUTÂNEA. / Aleksandro Souza do Lago. -- Salvador, 2017.  
90 f. : il

Orientador: Edgar Marcelino de Carvalho Filho.  
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós graduação em Ciências  
da Saúde) -- Universidade Federal da Bahia, Universidade  
Federal da Bahia, 2017.

1. Leishmaniose. 2. Tratamento. 3. Idosos. 4. Resposta  
imunológica . 5. Aspecto clínico. I. Marcelino de Carvalho  
Filho, Edgar. II. Título.



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



---

**ASPECTOS CLÍNICOS, IMUNOLÓGICOS E TERAPÊUTICOS DA**  
**LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM IDOSOS.**

**ALEXSANDRO SOUZA DO LAGO**

**Professor Orientador: Dr. Edgar Marcelino de Carvalho**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Ciências, da área de concentração em Ciências da Saúde.

**SALVADOR, BA**

**2017**

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

### **Membros Titulares**

- Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Olívia Bacelar - UFBA
- Prof. Dr. Marcus Lessa - UFBA
- Prof. Dr. Ricardo Rícchio - Fiocruz

### **Membro Suplente**

- Prof. Dr. Paulo Roberto Lima Machado- UFBA

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

- Universidade Federal da Bahia
- Faculdade de Medicina da Bahia
- Serviço de Imunologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Com-HUPES).
- Posto de Saúde de Corte de Pedra-Ba

**EQUIPE**

- Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Mestre e Doutor, Faculdade de Medicina da Bahia- UFBA.
- Augusto Marcelino de Carvalho, Mestre e Estudante de Doutorado do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz (FIOCRUZ).
- Ednaldo Lima do Lado, técnico em saúde, Centro de Referência em Leishmaniose, Corte de Pedra.
- Lucas Pereira Carvalho, Mestre e Doutor, Faculdade de Medicina da Bahia-UFBA.
- Luís Henrique Guimarães, Mestre e Doutor UFSBA.
- Maria Neuza do Santo Souza do Lago, Enfermeira, Centro de Referência em Leishmaniose, Corte de Pedra.
- Maria Olivia Bacelar, Mestre e Doutora, Serviço de Imunologia, COM-HUPES.
- Maria Odônio Ferreira, auxiliar técnico, Centro de Referência em Leishmaniose, Corte de Pedra.
- Maurício Teixeira Nascimento, Estudante de Mestrado da Faculdade de Medicina da Bahia-UFBA.
- Paulo Roberto Lima Machado, Mestre e Doutor, Serviço de Imunologia, COM-HUPES.

**FONTE DE FINANCIAMENTO**

- National Institutes of Health (NIH) AI030639
- Comitê Nacional Pesquisa (CNPq) Ministério de Ciência, Tecnologia (MCT)
- Bolsa de estudo pela coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES

*“Sem sonhos, a vida não tem brilho”.  
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.  
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. ”*

**Augusto Cury**

***Dedicatória***

*A minha família, amigos e por todo incentivo e apoio.*

## **AGRADECIMENTOS**

À **Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho**, por todos os ensinamentos, orientações, críticas e sugestões concedidas durante este período.

À **Ednaldo Lima do Lago**, meu pai, por todas as horas de dedicação, ensinamentos e questionamentos.

À **Maria Neuza do Santo Souza do Lago**, minha mãe e amiga, por todo incentivo, amor e dedicação.

Às minhas irmãs, por todo incentivo, apoio.

À minha namorada **Graziella Reis**.

À **Dra. Olivia Bacelar, Dr. Luiz Henrique Guimarães, Dr. Paulo Machado**.

À **Cristiano Sampaio Franco** do Serviço de Imunologia.

A **Elisângela Novais** do Serviço de Imunologia.

À **Elisângela Messias** do Serviço de Imunologia.

A todos os amigos e colegas do **PPgCS** e do **Serviço de Imunologia**.

Aos funcionários do **Posto de Saúde de Corte de Pedra**.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>133</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>144</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>155</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
2.1 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.2 FORMAS CLÍNICAS DAS LEISHMANIOSES TEGUMENTARES.....	24
2.3 RESPOSTA IMUNE NAS LEISHMANIOSES.....	26
2.4 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES.....	29
2.5 A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO IDOSO.....	32
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
3.1 GERAL.....	33
3.2 ESPECIFICO.....	33
<b>4. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
4.1. CASUÍSTICA.....	34
4.2. LOCAL DO ESTUDO.....	35
4.3. DIADNÓSTICO CLINICO E LABORATORIAL DA LC.....	36
4.3.1IDRM.....	36
4.3.2. DETECÇÃO DE DNA DE PARASITO.....	36
4.3.3.CULTURA DE LEISHMANIA.....	37
4.3.4. ESTUDO HISTOPATOLÓGICO.....	38
4.3.5. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	39
4.3.6. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	39
4.3.7 AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA.....	39

4.3.8. AVALIAÇÃO LABORATORIAL ADICIONAL.....	40
4.3.9. TRATAMENTO.....	41
<b>5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>41</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>81</b>
<b>11. TCLE.....</b>	<b>89</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1: Mapa do Estado da Bahia. Em vermelha área Endêmica de Corte de Pedra.**

**Figura 2: Lesão Cutânea em Membro Inferior de um Paciente Idoso (A) e um Jovem (B) Pareado por Sexo e com Duração de Doença.**

**Figura 3: Produção de IFN- $\gamma$  (A), TNF (B), IL-10 (C), IL-1 $\beta$  (D) e CXCL9 (E) em Sobrenadante de Culturas de Células Mononucleares Estimuladas com Antígeno de Leishmania em Pacientes Jovens e Idosos.**

**Figura 4: A Influência da Neutralização da IL-10 na Produção de IFN- $\gamma$  e Razão Entre IFN- $\gamma$  e IL-10 em Jovens e Idosos.**

**Figura 5. A Produção de IL-1 $\beta$ , TNF e IFN- $\gamma$  em Sobrenadante de Biópsia de Controles não Infectados de Pacientes Jovens e de Idosos com LC.**

**Figura 6. Evolução de um Paciente Jovem e de um de Paciente Idoso que Apresentaram Cura com 90 dias.**

**Figuras 7. Evolução de Lesão Ulcerada em um Paciente Idoso e um Jovem que Tiveram Falha Terapêutica ao Antimonial**

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1: Espécies de Leishmania, Formas Clínicas e Principais Vetores.**

**Tabela 2: Tabela de Procedimento**

**Tabela 3: Aspectos Clínicos e Demográficos de Pacientes Idosos com Leishmaniose**

**Tabela 4: Aspecto Clínica e Demográfico de Pacientes Jovens com Leishmaniose Tegumentar**

**Tabela 5: Comparação Entre os Achados Demográficos e Clínicos de Pacientes Idosos e Jovens com Leishmaniose Cutânea**

**Tabela 6: Resposta Terapêutica ao Antimonial Pentavalente em Pacientes Idosos e Jovens com Leishmaniose Cutânea Devido a *Leishmania braziliensis***

**Tabela 7. Principais Eventos Adversos em Pacientes Idosos e Jovens com Leishmaniose Cutânea Tratados com Antimonial Pentavalente**

**Tabela 8. Principais Anormalidades Eletrocardiográficas Encontradas nos Pacientes jovens antes e durante o tratamento com antimonial pentavalente**

**Tabela 9. Principais Anormalidades Eletrocardiográficas Encontradas nos Pacientes Idosos Antes e Durante o Tratamento com Leishmaniose Cutânea Tratados com Antimonial Pentavalente**

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**IDRM: Intradermorreação de Montenegro**

**LC: Leishmaniose Cutânea**

**LD: Leishmaniose Cutânea Disseminada**

**LM: leishmaniose Mucosa**

**LCD: Leishmaniose Cutânea Difusa**

**LCR: Leishmaniose Cutânea Recente**

**LV: Leishmaniose Visceral**

**LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana**

**MS: Ministério da Saúde**

**OMS: Organização Mundial da Saúde**

**PCR: Reação em Cadeia da Polimerase**

**Sbv: Antimonial Pentavalente**

**ECG: Eletrocardiograma**

**AST-ALT: Transaminase**

## RESUMO

**Introdução:** A leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta formas clínicas bem definidas, como a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucosa (LM), a leishmaniose cutânea difusa (LCD) e a leishmaniose disseminada (LD). Adicionalmente cerca de 1% dos pacientes apresentam lesões não usuais ou atípicas, por essas diferirem da descrição clássica, com lesões não ulceradas ou úlceras grandes. A LC se caracteriza por úlceras bem delimitadas com bordas infiltradas elevadas e com fundo granuloso. A LC é uma doença que compromete predominantemente adultos, jovens do sexo masculino, mas o número de crianças e idosos com a doença tem aumentado nos últimos anos. Ainda existe uma escassez de trabalhos sobre a LC nos idosos. **Objetivo:** Comparar as manifestações clínicas e reações adversas ao tratamento em pacientes idosos e jovens com LC acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, estado da Bahia. **Material e Métodos:** Participaram do estudo 35 pacientes idosos com idade entre 60 e 80 anos e 36 pacientes jovens com idade de 18 a 40 anos com diagnóstico de LC que procuraram o centro de referência de Corte de Pedra no período janeiro de 2015 a setembro de 2016. Todos os pacientes foram tratados com antimonial pentavalente, o glucantime (Sanofi-Aventis) na dose correspondente a cada paciente e foram realizados os exames laboratoriais, hemograma completo, sódio, ureia, creatinina, glicemia, potássio, TGO-TGP e eletrocardiograma. Foram avaliados também os efeitos colaterais em todos os pacientes. **Resultados:** Dos 72 pacientes selecionados para participarem do estudo, 1 foi excluído porque o diagnóstico não foi confirmado. Não houve diferença entre os 2 grupos com relação a duração da doença e localização e tamanho da lesão. Enquanto em 58% dos idosos não foi detectado linfadenopatia, este achado foi observado em 86% dos jovens  $P < 0.05$ . Os dois grupos responderam ao tratamento com antimonial de forma semelhante. Não houve diferença com relação à ocorrência de reações adversas como náuseas, vômitos, artralgia, mialgia, mas a frequência de alterações eletrocardiográficas foi mais elevada entre os idosos com (54%). **Conclusões:** A alta frequência de alterações eletrocardiográficas e a ocorrência de um óbito entre os idosos durante o tratamento indicam que drogas alternativas ao antimonial devem ser utilizadas para tratamento da leishmaniose cutânea em indivíduos acima de 60 anos de idade.

**Palavras chave:** Leishmaniose; *Leishmania (V.) braziliensis*; Leishmaniose Cutânea; Antimônio Pentavalente; Idosos.

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) representa um conjunto de doenças com características clínicas, imunológicas e patológicas distintas cuja expressão depende de fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro. A doença tem uma ampla distribuição no território brasileiro, ocorrendo casos em todas as regiões geográficas (**Costa SM et al, 2007**). A variedade de vetores (**Dantas-Torres F et al, 2007**) e a existência de diferentes ambientes geográficos, com suas respectivas características de clima e vegetação (**Costa SM et al, 2007**), tornaram a leishmaniose no Brasil uma doença de múltiplas facetas, com diferenças no tocante a apresentação clínica e resposta ao tratamento, que dificultam a homogeneização de métodos diagnósticos e terapêuticos. Os principais parasitas implicados na LTA no Brasil são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) amazonensis* e *L. mexicana mexicana*. (**Desjeux et al., 1992; Lainson et al., 1983**).

No Brasil são reconhecidas quatro formas clínicas distintas da LTA. A leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose cutânea disseminada (LD) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD). Enquanto a infecção por *L. amazonensis* e a *L. guyanensis* na região Amazônica normalmente se associa com lesão única, boa resposta terapêutica e cicatrização espontânea (**Silveira FT et al, 1991**), a *L. braziliensis* é responsável pelas formas mais graves da doença, incluindo a forma mucosa (**LAINSON et al, 1983 e Walton BC et al, 1980**) e a LD. A forma anérgica da doença (LCD) tem como agente causal em nosso país a *L. amazonensis* (**Barral A et al., 1991**), parasito que também pode se associar com LM e a LD.

A LC é a forma mais comum de apresentação da LTA, ocorre em mais de 90% dos casos em áreas de transmissão de *L. braziliensis* e caracteriza-se por uma lesão papulosa que evolui, com a formação da úlcera típica, indolor de fundo granuloso e bordas elevadas localizadas em superfícies expostas do corpo. Geralmente a lesão cutânea é acompanhada de linfadenopatia satélite dolorosa. (Bailey & Lockwood, 2007; SVS/MS, 2010).

O tratamento padrão da LC é feito com o antimonial pentavalente (Sbv) na dose de 15-20mg/Kg por dia durante 20 dias, conforme recomendação do Ministério da Saúde (MS) (SVS/MS, 2010). No entanto, a falha na resposta ao tratamento tem sido descrita em até 50% dos pacientes (Romero *et al*,2001; Santos *et al*, 2004) e o longo período de 60 a 90 dias necessário para a cicatrização da lesão ulcerada, indicam a necessidade da utilização de drogas alternativas para o tratamento da doença. Outros medicamentos eficazes no tratamento da doença são a pentamidina e anfotericina B (Bailey & Lockwood, 2007; Reveiz *et al*, 2013). Todavia o uso da anfotericina B é limitado seja pela toxicidade, seja pelo fato de a via parenteral dificultar a adesão e a regularidade do tratamento na zona rural. A miltefosina é uma droga de uso oral que se mostrou eficaz no tratamento da LC causada por *L.braziliensis* e por *L.guyanensis* (Machado *et al*,2010, Reveiz *et al*,2013), mas sua utilização ainda não foi liberada no Brasil. Nesse contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de opções terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas para o tratamento da LTA. A LC é bem documentada em idosos e na área endêmica onde foi realizado o presente estudo. Com o aumento no número total de casos da doença em um período de 20 anos, foi observado que o número de pacientes com leishmaniose com idade acima dos 60 anos duplicou neste período de tempo. (Jirmanus *et al*,2012). Algumas reações adversas associadas ao uso do Sb, tais como artralgia, mialgia, dor abdominal, cefaleia, náuseas, vômitos, fadiga e febre são mais

frequentes em idosos, sendo observadas em cerca de 60% dos idosos com LC tratados com antimonial (**Diniz DS *et al*,2012**).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* em que o homem é considerado como infectado ocasionalmente. Mais de uma dezena de espécies de leishmania podem causar doença no homem sendo a transmissão ao ser humano feito pela picada de flebótomos fêmeas. Mais de 30 espécies de flebótomos podem transmitir as diferentes espécies de leishmania (**Miranda JC et al.,2002**). As leishmanioses podem se caracterizar predominantemente por manifestações na pele ou nas mucosas sendo agrupadas como leishmaniose tegumentar. Alternativamente, o parasito pode acometer diversos órgãos como o baço, medula óssea e gânglios linfáticos (**MS 2000**), como na leishmaniose visceral. O gênero *Leishmania* compreende parasitas com um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, estes últimos sendo responsáveis pela transmissão dos parasitas de um mamífero a outro. Nos hospedeiros mamíferos, representados na natureza por várias ordens e espécies, os parasitas assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário. À medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem liberando parasitas que são fagocitados por outros macrófagos. Todas as espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da sub-família Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Nos flebotomíneos as leishmanias vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo. Ali as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas flageladas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas (**Killick-Kendrick R. et al.,1991**). Com a multiplicação destas formas existe perda da fonte de energia,

ocasião em que os flebótomos fazem o repasto sanguíneo. Nesta fase as formas promastigotas se transformam em promastigotas metacíclicas e são inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada.

O homem é considerado um hospedeiro acidental das leishmanias e parece não ter um papel importante na manutenção dos parasitas na natureza. Constitui-se exceção a *L. donovani*, onde o homem é uma fonte importante de armazenamento do parasito e tem papel na cadeia transmissora. A inoculação da *L. braziliensis* determina lesão cutânea na porta de entrada, de aspecto pápulo-vesiculososo ou impetigóide, que pode evoluir para regressão espontânea. A infecção pode continuar sua marcha, surgindo lesões cutâneas e invasão posterior da mucosa nasofaringe (**Furtado T. et al., 1994**).

As leishmanias foram inicialmente descritas na Ásia, África e Europa. A *L. tropica* e a *L. major* são as principais espécies causadoras de leishmaniose cutânea no Velho Mundo e a *L. donovani* e a *L. infantum* as principais espécies causadoras da leishmaniose visceral. A LTA é causada predominantemente pelas *L. braziliensis* e a *L. guyanensis*. Todavia mais de uma dezena de espécies de leishmania podem causar doença no homem nas Américas tais como a *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. peruviana*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. guyanensis*, *L. shaw*, *L. lainsoni*.

Na tabela 1 são mostradas as espécies de *Leishmania* com doenças causadas por estes parasitos no homem e os principais flebótomos transmissores destes agentes infecciosos.

**Tabela 1. Espécies de *Leishmania*, Formas Clínicas e Principais Vetores.**

<b>Espécies de <i>Leishmania</i></b>	<b>Forma clínica</b>	<b>Espécies de flebótomos</b>
<i>Leishmania infantum</i>	LV	<i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Lutzomyia evansi</i>
<i>Leishmania infantum</i>	LV, LC	<i>Phlebotomus perniciosus</i> , <i>Phlebotomus ariasi</i> , <i>Phlebotomus tobbi</i> , <i>Phlebotomus neglectus</i>
<i>Leishmania donovani</i>	LV	<i>Phlebotomus argentipes</i> , <i>Phlebotomus orientalis</i> , <i>Phlebotomus martini</i>
<i>Leishmania tropica</i>	LC	<i>Phlebotomus sergenti</i>
<i>Leishmania major</i>	LC	<i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>Phlebotomus duboscqi</i> , <i>Phlebotomus salehi</i> , <i>Phlebotomus bergeroti</i>
<i>Leishmania braziliensis</i>	LC, ML, LD	<i>Lutzomyia intermedia</i> , <i>Lutzomyia whitmani</i> , <i>Lutzomyia migonei</i> , <i>Lutzomyia wellcomei</i> , <i>Lutzomyia ovallesi</i>
<i>Leishmania amazonensis</i>	LC, LCD	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>
<i>Leishmania guyanensis</i>	LC, LM	<i>Lutzomyia umbratilis</i> , <i>Lutzomyia anduzei</i> , <i>Lutzomyia whitmani</i>
<i>Leishmania mexicana</i>	LC, LCD	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i> , <i>Lutzomyia shannoni</i> , <i>Lutzomyia diabolica</i>

O *Lutzomia intermedia* e o *Lutzomia whitmany* são os principais vetores transmissores da doença para o homem na região de Corte de Pedra, área endêmica em que o presente estudo foi desenvolvido (**Miranda JC et al,2002**).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a leishmaniose como uma das seis mais importantes doenças tropicais por sua alta prevalência, morbidade e mortalidade. Estima-se a ocorrência de 500 mil casos de LV e de cerca de 1 a 1.5 milhões de casos da leishmaniose tegumentar por ano nos quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia) distribuídos em 88 países (**Alvar J et al,2012**). No Brasil a leishmaniose tegumentar tem distribuição em todas as regiões, sendo mais prevalente nas regiões Norte e Nordeste. Segundo dados do DATASUS, de 2001 a 2012 houve 315.670 casos de LTA no Brasil, notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (**SINAN NET**), sendo 228.122 (72.3%) destes concentrados no Norte e Nordeste. Nessas regiões, destacam-se os estados da Bahia e Pará com os maiores números de casos, 38.362 e 48.659, respectivamente.

A LC ocorre predominantemente nas áreas rurais de florestas e matas e em jovens do sexo masculino. Todavia nos últimos anos com as mudanças na ecologia e predominantemente nas condições climáticas, a doença deixou de ocorrer somente nestas áreas, mas também no peri e no intra-domicílio, e passou a ser observado um aumento no número de casos em crianças, mulheres e em idosos (**Jirmanus L et al,2012**).

## 2.2 FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A LC é a forma mais comum de apresentação de LTA, ocorre em mais de 90% dos casos em áreas de transmissão de *L. braziliensis* e caracteriza-se por uma lesão papulosa que evolui para ulceração, com a formação de úlcera típica, indolor de fundo granuloso e bordas em moldura, de localização em superfícies expostas do corpo. A linfadenopatia regional é uma manifestação importante da doença causada pela *L. braziliensis* e pode ser a primeira manifestação da LC (Barral A *et al.*, 1995). Na fase inicial da LC a doença se caracteriza por uma pápula ou nódulo e somente 2 ou 4 semanas depois aparece a ulcera clássica. Esta fase da doença é denominada de leishmaniose cutânea recente (LCR) e o paciente habitualmente relata ter menos de 20 dias de duração da doença (Machado PM *et al.*, 2002).

A LM caracteriza-se por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores sendo a mucosa nasal afetada em mais de 90% dos casos (Lessa MM *et al.*, 2007). A forma clássica de LM é secundária à lesão cutânea ocorrendo habitualmente após ou durante o tratamento da LC. Estima-se que 3 a 5% dos casos de LC desenvolvam lesão mucosa, geralmente anos após a doença cutânea, ou raramente, concomitante ou após algumas semanas da lesão cutânea. Todavia lesão primária da mucosa nasal pode ser documentada (Jones TC *et al.*, 1987). A LM é considerada uma forma grave, agressiva e hiperérgica da LTA. O quadro clínico da doença mucosa se caracteriza por coriza, obstrução nasal, rinorréia, e em alguns casos, pode haver presença de odor fétido. Em cerca de 1% dos casos pode haver acometimento apenas da laringe, faringe e da boca (Lessa MM *et al.*, 2007). De acordo com o exame clínico das mucosas, a doença é classificada em 5 estágios (Lessa HA *et al.*, 2012). As lesões se iniciam como uma nodulação esbranquiçada sem ulceração, geralmente no septo

cartilaginosa (área de Kiesselbach) e cabeça das conchas inferiores, sendo classificada como estágio 1. No estágio 2, a lesão granulosa é fina, com ulceração superficial e presente no septo anterior, conchas inferiores e assoalho da fossa nasal. Em seguida, a doença evolui para ulceração profunda, com tecido de granulação intenso e infiltração da mucosa, atingindo cartilagem, tecido subcutâneo e pele da base da pirâmide nasal, tornando o septo alargado, caracterizando o estágio 3. Nessa fase, crostas hemáticas podem ser observadas sobre o septo, conchas inferiores e assoalho das fossas nasais, que sangram facilmente ao toque. É nessa fase que o nariz adquire o aspecto conhecido como nariz de anta ou tapir. O estágio 4 apresenta-se com envolvimento cartilaginosa do septo anterior com necrose e, às vezes, comprometimento da columela. Nesse estágio há perfuração do septo cartilaginosa e infiltração do septo posterior. Na forma mais avançada, no estágio 5, defeito estético, pode ocorrer destruição total da columela e queda da ponta do nariz (**Lessa HA et al,2012**).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma entidade rara e no nosso meio está associada com a *L.amazonensis*. É caracterizada por lesões papulares ou nodulares não ulceradas e a histopatologia mostra uma predominância de macrófagos com formas amastigotas do parasito no seu citoplasma. Esta apresentação clinica está relacionada com diminuição da resposta imune celular (**Bomfim G et al, 1996**).

A LD é uma forma emergente da LTA, que se caracterizam pela presença de 10 ou mais lesões acneiformes, papulares e ulceradas em pelo menos duas partes distintas do corpo. O paciente habitualmente apresenta uma lesão ulcerada clássica e subitamente após dias ou semanas da lesão primaria tem um episódio de febre e calafrios seguidos do aparecimento das múltiplas lesões. A disseminação da doença ocorre por provável via hematogênica e o acometimento mucoso é descrito em até 44% dos casos (**Turetz et al,**

2002, Machado PR *et al*,2011). É considerada uma forma grave e de difícil manejo terapêutico (Machado PR *et al*, 2015).

Existem também formas atípicas da doença como as lesões vegetantes observadas em gestantes e lesões grandes como as observadas em pacientes co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Guimarães LH *et al*,2009).

A forma subclínica ou inaparente (Follador *et al*, 2002; Bittar RC *et al*, 2007) é o reconhecimento da infecção sem manifestação de doença, e seu diagnóstico é baseado em um teste de hipersensibilidade tardia com antígeno de leishmania positivo ou pela documentação da produção de IFN- $\gamma$  em culturas de células sanguíneas estimuladas com antígeno de leishmania em indivíduos residentes em áreas de transmissão de LTA sem histórico de LTA presente ou passada (Schnoor *et al*,2012).

### 2.3-RESPOSTA IMUNE NAS LEISHMANIOSES

O controle das infecções causadas por agentes intracelulares é predominantemente dependente da resposta imune celular. Na LC o controle da doença está relacionado com a produção de IFN- $\gamma$  que é o principal fator ativador de macrófagos e consequentemente estimula a destruição do parasita por estas células (Scott P *et al*,1988). Todavia, em indivíduos naturalmente resistentes a infecção por *L. braziliensis*, residentes em área endêmicas e com infecção subclínica o controle do processo infeccioso está associado com a resposta imune inata, e se caracteriza por diminuição da penetração da *Leishmania* em monócitos e maior atividade leishmanicida de macrófagos (Giudice A *et al*,2012, Muniz AC *et al*,2016). Nestes indivíduos enquanto a presença de um teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno de leishmania não se associa com proteção

contra a doença, a produção de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de células sanguíneas estimuladas com antígeno de leishmania é um marcador de proteção contra a LC (Muniz AC *et al*,2016). Na leishmaniose experimental é bem documentado o papel de uma resposta TH1 na proteção contra leishmania (Liew FY *et al*,1999, Heinzl, *et al*, 1991, Scott *et al*,1988). Na LCD causada no nosso meio pela *L.amazonensis* também conhecida como forma anérgica da leishmaniose tegumentar, as lesões nodulares características da doença tem predominância de macrófagos infectados pelo parasito (Barral-Netto M *et al*,1986). Nestes pacientes a reação de hipersensibilidade tardia ao antígeno de leishmania é negativa e linfócitos destes pacientes, produzem pouco ou não produzem IFN- $\gamma$  quando estimulados com antígenos do parasito (Barral-Netto M *et al*,1986, Bonfim *et al*,1996). A patogênese da LC depende do parasito, do vetor e da resposta imune do hospedeiro. A ausência de resposta imune celular a antígenos de leishmania se associa com lesões múltiplas e nodulares e com muitos parasitos nos macrófagos como a observada na leishmaniose cutânea difusa (Barral A *et al*, 1995). Todavia pacientes com LC causada por *L. braziliensis* produzem concentrações elevadas de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias incluindo IFN-  $\gamma$ , mas esta exuberante resposta Th1 não impede o desenvolvimento da doença. Adicionalmente, esta resposta inflamatória exagerada contra o parasita resulta em dano tecidual e desenvolvimento da úlcera (Unger A *et al*, 2009, Bacellar O *et al*,2002). Na LC existe uma correlação direta entre a frequência de células TCD4+ expressando TNF ou IFN- $\gamma$  com o tamanho da ulcera (Antonelli *et al*,.2005), a citotoxicidade mediada pelas células CD8 se relaciona com a intensidade do processo inflamatório e a lesão tecidual (Santos CS *et al*,.2014, Cardoso TM *et al*,.2014), e monócitos/macrófagos apresentam uma maior explosão respiratória, secretam concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias, mas tem uma diminuição da capacidade leishmanicida em comparação

com células de indivíduos com infecção subclínica (**Cardoso T et al,2014, Carneiro PP et al.,2016**). Adicionalmente, a associação do antimonial pentavalente, principal droga recomendada no Brasil para tratamento das leishmanioses, com drogas que diminuem a resposta inflamatória como a pentoxifilina ou o fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é mais eficaz que o antimonial isoladamente (**Almeida RP et al.,2005, Machado PR et al.,2007**) e cura pacientes refratários ao antimonial (**Almeida RP et al.,2005, Lessa HA et al.,2001**). Estes dados mostram que a resposta imune à infecção por *L.braziliensis* se relaciona com controle da doença mais também com a lesão tecidual.

O mecanismo da resposta imune exarcebada na LTA se relaciona tanto com o parasito como o hospedeiro. Tem sido bem documentado que a *L.braziliensis* é polimórfica na área endêmica de Corte de Pedra e diferenças genotípicas entre isolados da mesma espécie se associam com diferentes formas clínicas da LTA (**Schriefer et al., 2004 e Queiroz A et al., 2012**). A *L.braziliensis* isolada de pacientes com LD difere fenotipicamente dos isolados de pacientes com LC e LM. O antígeno solúvel de leishmania produzido com isolados de pacientes com a forma disseminada da doença induz mais produção de TNF e de IFN- $\gamma$  que antígenos preparados com isolados de pacientes com LC (**Leopoldo PT et al, 2006**). Com relação ao hospedeiro, macrófagos de pacientes com LC ou LM produzem maior quantidade de quimiocinas e citocinas pro-inflamatórias que células de indivíduos sadios ou com infecção sub-clínica por *L.braziliensis* (**Giuldice A et al,2012**). A regulação da resposta imune tem um papel fundamental na homeostasia do sistema imunológico e participam desta regulação células com macrófagos, linfócitos T, linfócitos B, células dendríticas, citocinas reguladoras da resposta imune e moléculas com propriedades moduladoras que se expressam em células da resposta imune. Nos pacientes com LTA tem sido documentado um defeito na modulação da resposta imune.

Comparado com indivíduos sadios a modulação da resposta imune exercida pela IL-10 e TGF- $\beta$  é menor em pacientes com LC e com LM (**Bacelar O *et al*, 2002**). Esse defeito na modulação da resposta imune é mais evidente na LM do que na LC e a frequência e intensidade da expressão do receptor para IL-10 em pacientes com LM pode explicar a resposta imune mais exacerbada nestes pacientes do que na LC (**Farias DR *et al*, 2005**)

#### **2.4-TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES**

O antimônio trivalente foi a primeira droga a ser usada no tratamento das leishmanioses e durante mais de 50 anos os antimônios pentavalentes foram as únicas drogas usadas no tratamento dessa doença. A dose recomendada de antimônio pentavalente para tratamento da LC é de 20mg/Sbv/Kg/dia por 20 dias. As principais drogas no mercado são o glucantime (Sanofi Aventis) que é o antimoniato de meglumina e o Pentostan (**Gontijo B *et al*, 2003**) que é o estibogluconato de sódio. A droga recomendada de primeira escolha pelo Ministério da Saúde do Brasil é o glucantime. A administração é predominantemente por via endovenosa embora pequenas doses possam ser administradas por via intramuscular. Em pacientes com LM e LD é recomendado o uso de 20mg/Kg/peso por 30 dias. Se não houver cicatrização completa da lesão após 90 dias de início do tratamento ou a despeito de haver cicatrização da ulcera as bordas persistirem elevadas o tratamento deve ser repetido. A dose diária não deve ultrapassar 15 ml (**MS 2000**). No Brasil o glucantime como citado acima é o antimônio utilizado para tratamento das leishmanioses e é fornecido gratuitamente pelo governo. Em caso de não resposta clinica ou da impossibilidade do uso do antimônio, a droga de segunda escolha é a anfotericina B. A anfotericina B é mais eficaz que o antimônio pentavalente, mas seu uso é limitado pela necessidade de internação hospitalar e devido a sua elevada toxicidade principalmente por causar insuficiência renal (**Neves LO *et al***,

2011). Várias outras drogas como a pentamidina e a aminosidina tem se mostrado eficazes no tratamento das leishmanioses (**González U *et al.*, 2009**), mas também pelas reações adversas estas drogas têm uso limitado. Várias drogas de uso oral têm sido testadas no tratamento da LTA com resultados contraditórios. Recentemente em um estudo aberto e não controlado e com a utilização de diferentes doses, o Fluconazol foi eficaz no tratamento da LC causada por *L.braziliensis* (**Sousa AQ *et al.*,2011**). Em um estudo randomizado com a utilização do Fluconazol na dose (6,5-8,0 mg / kg /durante 28 dias), a falha terapêutica foi observada em 21 (78%) de pacientes com LC (**Prates FV *et al.*, 2017**). A miltefosine é a única droga oral recomendada para o tratamento das leishmanioses. A miltefosina é uma droga antitumoral e foi utilizada com sucesso no tratamento da LV na Índia (**Sundar S *et al.*, 2013**). A miltefosina é eficaz no tratamento da LC causada por *L. braziliensis* e por *L. guianensis* (**Reveiz L *et al.*,2013**). Em dois ensaios clínicos brasileiros, houve superioridade da miltefosina em comparação ao glucantime (**Machado PM *et al.* 2010, Chrusciak-Talhari A *et al.* 2011**).

Pacientes com LV causados pela *L. donovani*, *L. infantum* e a *L. aethiopica* têm sido tratados com a Anfotericina B na sua forma lipossomal, com menor toxicidade associada à terapia, redução no tempo de hospitalização e no tempo de cura da doença, além de taxa de cura mais elevada, em comparação com antimoniais pentavalentes (**Minodier & Parola, 2007; Solomon *et al.*, 2007, 2013; Wortmann G *et al.*, 2010**). A anfotericina B lipossomal tem sido pouco utilizada na LC mais sua eficácia em pacientes com LC, LM e LD refratários a antimoniais pentavalentes tem sido bem documentada (**Minodier & Parola, 2007; Solomon *et al.*, 2007, 2013; Wortmann G *et al.*, 2010**). Todavia, mais estudos prospectivos controlados são necessários para o estabelecimento do melhor regime terapêutico da Anfotericina B lipossomal e do seu real custo-benefício no tratamento da LC. O alto custo desta medicação é o principal fator

limitante deste tratamento em países pobres, que são os locais mais endêmicos das leishmanioses (**Minodier & Parola, 2007; Solomon et al, 2007, 2013; Wortmann G et al, 2010**).

Existe na literatura uma carência de trabalhos relacionados à LTA em idosos. A resistência ao tratamento com o antimonial tem mecanismo desconhecido. Bases multifatoriais da resposta terapêutica têm obscurecido a relação susceptibilidade à droga (**Rojas R et al., 2006**) e resposta clínica. Fatores como: imunidade do hospedeiro, fatores farmacológicos, manufatura e lote da droga, susceptibilidade das diferentes espécies de *Leishmania* influenciam nessa relação. Em geral, a resistência ao Sb<sup>v</sup> é adquirida durante o tratamento (**Rojas R et al., 2006**) e varia de 10 a 40% dos casos (**O'neal SE et al., 2007**). É bem documentado que a resposta ao antimonial varia de acordo com a espécie, e que espécies do mesmo complexo podem ter diferentes evoluções (**Arevalo J et al., 2007**). Os mecanismos de resistência são diversos e os detalhes, escassos. Todas essas limitações descritas relativas ao uso do Sb<sup>v</sup> têm estimulado a busca crescente por medicações alternativas no tratamento da LTA. Assim, muitas drogas têm sido testadas, mas nenhuma demonstrou qualidades e vantagens suficientes para ser considerada como a droga de primeira escolha no tratamento da LC em todas as suas situações epidemiológicas (**Arana B et al, 2001**). Atualmente, as alternativas incluem outros medicamentos de uso parenteral como a pentamidina e anfotericina B (**Bailey & Lockwood, 2007; Reveiz et al, 2013; Croft SL et al, 2006; Minodier & Parola, 2007**), cujo uso torna-se limitado pela toxicidade e pela via de administração parenteral dificultar a adesão e a regularidade do tratamento na zona rural.

## 2.5 A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO IDOSO

É conhecida que a resposta imunológica é diminuída em idosos e, nesse contexto, poderia se esperar um aumento da susceptibilidade a infecção por parasitas do gênero *Leishmania* e maior gravidade da doença neste grupo etário. Todavia como na LTA a resposta imune pode contribuir tanto para controlar a infecção como para a ocorrência de dano tecidual, a doença no idoso poderia ser tanto mais grave como mais atenuada, na dependência da resposta imunológica desenvolvida contra o parasito e da resposta imune patológica. Com relação à resposta terapêutica, em um estudo aberto com a participação de 44 pacientes entre 60 a 92 anos tratados com uma ou mais series de antimonial na dose de 5 mg/Kg de peso por via intramuscular durante 10 dias, todos os pacientes foram curados. Destes três casos (7%) apresentaram recidiva após 3 meses de acompanhamento (**Camargo Ferreira e Vasconcellos et al., 2010**). Reações adversas foram observadas em 66% dos casos e 20% necessitaram interromper temporariamente o tratamento (**Diniz DS et al.2012**). Algumas reações adversas associadas ao uso do Sb, tais como artralgia, mialgia, dor abdominal, cefaleia, náuseas e vômitos, fadiga e febre são mais frequentes em idosos. (**Diniz DS et al.,2012**) também observaram reações adversas em cerca de 60% dos idosos com LC tratados com antimonial. Em nenhum desses dois estudos foi feito uma análise comparativa entre manifestações clínicas, respostas terapêuticas e efeitos adversos em idosos com pacientes adultos jovens.

Neste trabalho, iremos avaliar a influência da idade nas manifestações clínicas causadas pela infecção por *L. braziliensis*. Os resultados deste estudo podem ajudar a preencher uma importante lacuna no conhecimento acerca da influência da idade no desenvolvimento da leishmaniose tegumentar.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVOS GERAL**

Comparar as manifestações clínicas, a resposta terapêutica e as reações adversas ao antimonial pentavalente em pacientes idosos e jovens com LC acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra/BA.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Comparar a resposta imune sistêmica e em biopsias de lesão de jovens e idosos com LC.
  
- II. Determinar a frequência e a gravidade das reações adversas ao Glucantime nos dois grupos de pacientes estudados.

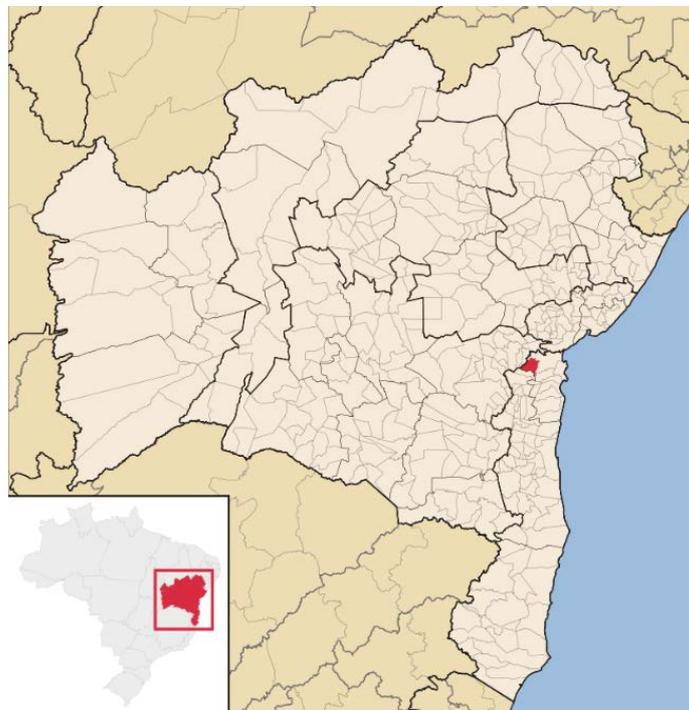
## **4. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. CASUÍSTICA**

No período de janeiro de 2015 a setembro de 2016, foram atendidos 1.654 pacientes portadores de LC, destes totais 125 eram idosos na Unidade de Saúde de Corte de Pedra, centro de referência para diagnóstico e tratamento de LTA. Foram selecionados para o estudo pacientes com diagnóstico confirmado de LC, divididos em 2 grupos para comparação: 1-Idosos: indivíduos com idade entre 60 a 80 anos, com um total de 35 pacientes. 2-Jovens: indivíduos com idade entre (18 a 40) anos, com um total de 36 pacientes e foram excluídos 90 pacientes idosos por ter alguma comodidade e recusa de não querer participar do estudo. Todos os pacientes participantes deste estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) e o projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Aprovado em 20-12-2012- Cadastro 25/12.

## 4.2. LOCAL DO ESTUDO

O povoado de Corte de Pedra está localizado a 280 km a sudeste de Salvador, capital do estado da Bahia (Figura 1). A importância desta região como uma área endêmica de LTA e de transmissão de *L. braziliensis* é conhecida há mais de 40 anos. O Centro de referência para leishmaniose tegumentar americana (LTA), foi criado há cerca de 30 anos em Corte de Pedra, município de Tancredo Neves e atende pacientes de 20 municípios compreendendo 9.935 km<sup>2</sup> com uma população de 454.000 habitantes.



**Figura 1: Mapa do estado da Bahia. Em vermelha área endêmica de Corte de Pedra.**

### **4.3 DIADNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DA LC**

Todos os pacientes foram submetidos a uma anamnese e exame físico. A história prévia de leishmaniose, duração da doença, número e tamanho das lesões, localização das úlceras apresentadas pelos pacientes e a existência, bem como o tamanho dos linfonodos satélites foram computados. O diagnóstico clínico da LC foi feito pela presença de 1 a 3 lesões com duração da doença entre 15 e 60 dias, o diagnóstico laboratorial confirmatório foi obtido pela positividade da intradermo reação de Montenegro (IDRM) associado a identificação do parasito por pelo menos um dos seguintes métodos: 1 DNA do parasito pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) ou por 2 isolamento do parasito em material obtido por punção da biopsia da lesão, ou pela 3 documentação de amastigota de *L. braziliensis* por estudo histopatológico.

#### **4.3.1 IDRM**

A IDRM foi realizada utilizando-se antígeno de *Leishmania* obtido de cepa de *L. braziliensis* (IOC L.2463, MHOM/BR/2001) como previamente descrito (Reed SG *et al.*, 1986), 25µg de antígeno em 0,1ml de solução foi injetada na superfície ventral de antebraço esquerdo e a induração medida no intervalo entre 48 a 72 horas, sendo considerado

#### **4.3.2-DETECÇÃO DE DNA DE PARASITO**

A detecção e determinação das espécies de leishmania isoladas dos pacientes com LC foram baseadas no PCR-RFLP do locus HSP70 (Garcia L *et al.*, 2004; Montalvo AM *et al.*, 2010) e, mais tarde confirmada por PCR em tempo real (Weirather JL *et al.*, 2011). Biópsias foram utilizadas neste estudo para confirmação da doença, coletadas a partir da

borda da lesão do paciente com LC proveniente de Corte de Pedra, e armazenada em tubos eppendorfs de 1,5mL, contendo RNA later (Thermo Fisher, Inc). A partir desta etapa, o DNA genômico foi extraído, utilizando o kit de extração DNA Purification Kit - Promega®, e em seguida armazenado à -20°C. Após a obtenção do DNA genômico, ensaios RT-PCR foram realizados. A determinação de espécies de *Leishmania* foi realizada por ensaios utilizando Custom TaqMan Gene Expression Assay® (Applied Biosystems Inc., EUA), utilizando a sequência do iniciador baseada em KDNA3, específica para *L. (V.) braziliensis* (Weirather JL et al., 2011). As sondas e os alvos específicos do iniciador a serem avaliados foram utilizados no ensaio. A reação foi realizada em um volume final de 10µL para cada amostra, consistindo na preparação de 5µl de Taqman Universal PCR Master Mix (2x) (mistura de reagentes contendo a enzima DNA polimerase) 0,75 µl do par de iniciadores - Reverse Primer (rv ) 10µM (5' 'GAA CGG GGT TTC TGT ATG CCA TTT-3') e Implante frente (fw) 10 µM (5'-TGC TAT AAA ATC GTA CCA CCC GAC A-) LbrMiniC3 6FAMTTG CAG AAC CCCC ACC CAG AGG CTAMRA). As amostras foram amplificadas utilizando o termociclador StepOne Plus® (Applied Biosystems Inc., EUA) com os seguintes parâmetros de ciclos térmicos: 95 ° C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95 ° C durante 15 segundos e 60 ° C durante 1 minuto. Os resultados de cada amostra foram analisados no Ct (Ciclo de Limiar), definido como o ciclo em que a fluorescência está acima da linha de base (linha de base automática) e atinge o limiar o teste positivo a presença de induração maior ou igual a 5 mm.

#### **4.4.3-CULTURA DE LEISHMANIA**

Para obtenção dos isolados parasitários de *L.(V) braziliensis* as amostras foram cultivadas a partir de aspirados das bordas das lesões dos pacientes. O material aspirado foi suspenso em meio bifásico LIT/NNN (tryptose/Novy, McNeal, Nicolle), e em seguida incubado entre 24°C e 26°C no período de aproximadamente 15 dias. Após esse período, foi identificado a presença de promastigotas viáveis no meio de cultura, sendo transferidas para o meio líquido Schneider (SCHNEIDER Insect Extract Medium, SIGMA®), suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor a 56°C (Gibco BRL, division of Invitrogen, GAITHERSBURG, USA), 2% de urina masculina humana, 2mM de L-glutamina e 2mL de antibiótico gentamicina 50µg/mL (Gibco BRL, division of Invitrogen, GAITHERSBURG, USA), e incubado entre 24°C e 26°C durante um período máximo de duas semanas, até que os parasitos atingissem fase logarítmica tardia de crescimento (uma suspensão de aproximadamente 1x10<sup>7</sup> células/mL). Os parasitos foram congelados em DMSO a 10%, meio de crescimento a 90%, e posteriormente, armazenados em nitrogênio líquido para serem utilizados em ensaios para confirmação da espécie. Para a obtenção do DNA genômico dos isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, estes foram descongelados e cultivados em meio de cultura Schneider até os isolados promastigotas atingirem a fase estacionária de crescimento. Aproximadamente, 1,7mL de isolados promastigotas foram centrifugados a 200g por 10 minutos e o pellet foi ressuspenso em 150µL de TELT – tampão de lise (50mM TrisHCL pH 8.0; 62,5mM EDTA pH 9.0; 2,5M LiCl e 4% v/v Triton 100x).

#### **4.3.4-ESTUDO HISTOPATOLÓGICO**

Biopsia da borda da lesão foi realizada com “punch” de 4 mm após anestesia local, e fragmento obtido foi acondicionado em tampo plástico com solução de formol a 10% e

encaminhado ao Serviço de Anatomia Patológica do Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz – Bahia para análise histopatológica.

#### **4.3.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Diagnóstico clínico de LC pela presença de 1 a 3 lesões úlcera típica, indolor de fundo granuloso e bordas elevadas com duração de 15 a 60 dias; idade entre 18 a 40 anos ou 60 a 80 anos; sexo masculino ou feminino; confirmação laboratorial pela positividade da intradermoreação de Montengro (IDRM) associado a identificação do parasito por pelo menos um destes métodos: detecção do DNA do parasito pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR); isolamento do parasito em material obtido por punção da biopsia da lesão; documentação de amastigotas de *Leishmania* por estudo histopatológico.

#### **4.3.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Foi excluído um paciente, presença de diabetes mellitus, história pregressa de insuficiência cardíaca, hipertensão arterial não controlada e insuficiência renal; contraindicação do antimonial, recusa em participar do estudo.

#### **4.3.7 AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA**

Sangue periférico (30 mL) foi obtido de pacientes com LC em tubos heparinizados no dia 0. As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram separadas através do gradiente de concentração Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) por centrifugação (1450 RPM) e lavadas 2 vezes em solução salina (NaCl

0,9%) a 1290 RPM. Em seguida as CMSP foram coradas (corante Turk) e contadas em câmara de Neubauer. Após contagem, as CMSP ( $3 \times 10^6$ ) foram ressuspensas em 1mL de meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e gentamicina (0,5mg/mL) (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) em placas de 24 poços. As CMSP foram cultivadas na presença e/ou ausência do antígeno solúvel de *leishmania* (SLA 5µg/ml) e anti IL-10 (10µg/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN) durante 72 horas á 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após incubação de 72 horas, os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -70°C. Os níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-1 $\beta$  foram determinados através da técnica de ELISA “sandwich” (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Em resumo, as placas foram sensibilizadas com anticorpos de captura e incubadas overnight á temperatura ambiente. Após incubação, as placas foram bloqueadas com reagente diluente (PBS 1X + BSA 1%) durante 1 hora. Após o bloqueio, os sobrenadantes (50µl/poço) foram adicionados à placa e incubados durante 2 horas à temperatura ambiente. Após este período, as placas foram incubadas com anticorpo de detecção por mais 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado Streptavidina e as placas foram incubadas ao abrigo da luz por 20 minutos. Entre cada etapa foram realizadas 3 lavagens com (PBS 1X +Tween 20 à 0,05%). A reação foi revelada com uma solução enzimática (TMB) e interrompida com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Em todos os ensaios foram construídas curvas padrões com anticorpos recombinantes. Os resultados foram expressos em pg/mL.

#### **4.3.8-AVALIAÇÃO LABORATORIAL ADICIONAL**

Os pacientes realizaram exames laboratoriais no D0 e D30, (glicemia, ureia, potássio, creatinina, sódio, (AST, ALT)). Foi também realizado eletrocardiograma (ECG) no D0 e D 20 do tratamento.

#### **4.3.9. TRATAMENTO**

Todos os pacientes foram tratados com antimonial pentavalente (Glucantime® Sanofi Aventis, Brasil) com 20 mg/Kg/dia 3 vezes por semana (segundas, quartas e sextas feiras) até completar 20 doses. Neste estudo foi considerada falha terapêutica a ausência de cicatrização da lesão após 90 dias do início do tratamento.

### **5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados coletados nas fichas clínicas foram registrados em um banco de dados, como a amostra não apresentou distribuição normal, a análise estatística foi realizada com testes não paramétricos. Os dados da idade são apresentados como média  $\pm$  DP e as demais variáveis contínuas são apresentadas como medianas e variáveis. Os dados categóricos foram comparados utilizando o teste  $\chi^2$  ou o teste exato de Fisher e para variáveis contínuas o teste de Mann-Whitney foi utilizado. O Mann-Whitney também foi usado para avaliar as diferenças entre os níveis de citocinas entre os dois grupos e um valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

**Tabela 2: TABELA DE PROCEDIMENTO**

	<b>DIA 0</b>	<b>DIA 20</b>	<b>DIA 30</b>	<b>DIA 60</b>	<b>DIA 90</b>
EXAMES CLINICO	X		X	X	X
FOTO DA LESÃO	X		X	X	X
RESPOSTA IMUNE	X				
BIOPSIA	X				
EXAMES LABORATORIAIS	X		X		
ECG	X	X			
RESPOSTA TERAPEUTICA			X	X	X

## **6. RESULTADOS**

Foram incluídos no grupo de idosos 35 pacientes idosos e no grupo jovens 36, pareados por duração da doença  $\pm$  10 dias e quando possível por sexo. Em um dos pacientes do grupo de idosos não houve confirmação diagnóstica ficando o total da nossa amostra com 35 pacientes idosos e 36 pacientes jovens. Com relação a origem dos casos, 8 pacientes residiam em Presidente Tancredo Neves, 7 em Valença, e 15 pacientes eram originários de Nilo Peçanha, W. Guimarães e Teolândia com 5 pacientes em cada um destes municípios. As cidades de Gandu, Ituberá e Nova Ibiá contribuíram com 1 paciente cada. Dos 35 pacientes idosos 16 eram hipertensos em uso de losartana potássica isoladamente ou em associação com hidroclorotiazida e/ou besilato de anlodipino 5mg.

Os dados demográficos e as características clínicas dos pacientes idosos são mostrados na tabela 2 e dos pacientes jovens na tabela 3.

**Tabela 3: Aspectos Clínicos e Demográficos de Pacientes Idosos com Leishmaniose Tegumentar.**

IDADE	SEXO	NUMEROS DE LESÕES	LOCAL DA MAIOR LESÃO	TAMANHO DA MAIOR LESÃO (mmxmm)	DURAÇÃO DA DOENÇA (dias)	LINFADENOPATIA	TAMANHO DO LINFONODO (mmxmm)	IDRM (mmxmm)	TEMPO DE CURA (dias)
69	M	1	BRAÇO.E	05X04	30	SIM	30X12	20X20	54
77	F	1	PERNA.E	16X10	60	NÃO	ND	10X10	56
68	M	3	PERNA.D	20X18	30	SIM	15X10	12X10	224
67	M	1	PERNA.E	26X21	30	NÃO	ND	18X16	181
66	F	2	COXA.E	20X11	60	NÃO	ND	12X11	42
71	M	1	PERNA.E	20X20	30	NÃO	ND	14X13	Óbito
64	F	1	BRAÇO.D	20X18	60	SIM	12X02	12X10	112
78	F	2	PERNA.D	18X15	60	SIM	15X08	15X15	98
60	F	1	PERNA.E	30X26	60	NÃO	ND	15X11	74
60	F	1	PERNA.D	26X18	40	NÃO	ND	15X12	49
77	F	1	BRAÇO.D	15X14	60	NÃO	ND	15X15	60
72	F	1	PERNA.D	20X12	60	NÃO	ND	16X12	246
65	M	1	PERNA.E	30X20	45	NÃO	ND	17X17	47
63	F	1	COXA.E	55X25	30	NÃO	ND	28X25	57
60	M	1	BRAÇO.E	28X25	60	SIM	20X12	20X15	63
69	M	1	PERNA.E	20X10	35	SIM	15X07	15X10	92
77	M	2	COXA.D	20X18	25	NÃO	ND	09X09	143
67	M	1	PÉ.E	15X10	35	SIM	45X35	13X10	168
71	F	2	BRAÇO.D	16X11	30	SIM	22X20	14X14	133
62	M	1	PERNA.E	11X10	20	SIM	52X32	17X17	119
63	M	1	PÉ.D	19X10	40	SIM	36X22	14x14	63
74	M	1	PERNA.D	18X25	60	NÃO	ND	15X12	45
69	M	1	COXA.E	20X18	45	NÃO	ND	15X10	42
62	M	1	R.LOMB Á	20X14	60	NÃO	ND	16X12	83
66	F	1	BRAÇO.E	40x20	60	SIM	20X12	15x15	147
61	F	2	BRAÇO.D	19X14	21	NÃO	ND	22X21	62
65	F	1	PERNA.D	22.19	30	NÃO	ND	15X15	47
62	M	1	PERNA.E	15X10	30	NÃO	ND	15X15	116
67	M	4	PERNA.D	12X10	30	SIM	38X27	17X14	28
66	M	1	PERNA.E	15X13	45	SIM	60X35	22X20	63
64	F	1	PERNA.D	30X24	45	NÃO	ND	17X15	30
64	M	1	PERNA.E	30X29	40	NÃO	ND	20X20	125
67	F	1	BRAÇO.D	14X12	60	SIM	18X12	20X16	35
61	M	1	MÃO.E	10X05	20	SIM	27X24	16X16	118
62	M	1	PERNA.E	16X08	60	NÃO	ND	20X20	Lesão ativa

**Tabela 4: Aspectos Clínicos e Demográficos de Pacientes Jovens com Leishmaniose Tegumentar**

IDADE	SEXO	NUMEROS DE LESÕES	LOCAL DA MAIOR LESÃO	TAMANHO DA MAIOR LESÃO (mmxmm)	DURAÇÃO DA DOENÇA (dias)	LINFADENOPATIA	TAMANHO DO LINFONODO (mmxmm)	IDRM (mmxmm)	TEMPO DE CURA (dias)
21	M	2	BRAÇO.D	15X15	60	SIM	33X22	25X25	73
34	M	1	PERNA.D	17x10	21	NÃO	ND	20X17	56
40	F	1	COXA.E	22X08	40	SIM	05X03	13X12	292
18	F	1	NADEGAS. E	17x15	30	SIM	52X35	20X20	155
24	F	1	PERNA.E	12X10	31	NÃO	ND	22X22	477
38	M	1	PERNA.E	22X16	35	SIM	53X28	12X10	51
28	M	1	PERNA.E	20X12	36	SIM	45X23	16X12	47
30	M	1	PERNA.D	40X40	50	SIM	38X22	15X14	86
38	F	1	PERNA.D	28X14	40	SIM	40X15	19X15	48
34	F	1	PERNA.E	22X20	35	SIM	30X14	15X14	62
47	M	1	PÉ.D	28X14	15	SIM	46x22	21X20	52
31	M	1	PERNA.E	12X10	30	SIM	62X30	22X22	129
21	F	1	PERNA.E	16X12	20	NÃO	ND	12X10	119
37	M	1	PERNA.D	30X19	35	SIM	20X16	15x15	117
34	M	1	PERNA.E	23X10	35	SIM	45X36	14X12	63
38	M	1	PERNA.E	35X20	35	SIM	51X27	15x15	161
31	M	1	PERNA.E	15X12	40	SIM	70x40	20X17	96
31	M	2	PERNA.D	34X15	40	SIM	44x29	13x10	55
24	F	1	COX	15X10	40	SIM	32X10	12X12	149
19	M	2	PÉ.D	26X20	20	SIM	60X25	21x21	176
39	M	1	PÉ.E	11X07	30	SIM	35X17	17X15	120
23	F	1	BRAÇO. E	19X09	40	SIM	20X18	17X15	82
42	M	1	PERNA.E	13x12	30	SIM	68X45	15x15	62
38	M	1	PERNA.D	32X22	60	SIM	42X22	15x15	160
36	M	1	PERNA.E	11X06	30	NÃO	ND	12X10	96
23	M	1	PERNA.E	12X11	40	SIM	40X24	22x10	56
21	F	2	PERNA.D	24X10	30	SIM	12x08	15x15	184
43	M	2	PERNA.D	19X11	30	SIM	30X11	16X11	61
25	F	1	PERNA.E	15X10	20	SIM	25X10	15x15	118
37	F	1	BARRIGA	31X30	60	NÃO	ND	30X11	91
29	M	1	PERNA.E	13X11	60	SIM	30X25	19X19	53
20	M	1	PERNA.E	27X18	30	SIM	62X43	15X13	Lesão ativa
34	M	1	PERNA.E	18X14	60	SIM	65X41	20X15	Lesão ativa
22	F	1	BRAÇO.E	21X20	30	SIM	18X16	15X15	Lesão ativa
37	M	1	BRAÇO.E	14X12	20	SIM	20X10	11X10	Lesão ativa
39	F	1	PERNA.E	19X12	40	SIM	52X29	06X06	Lesão ativa

ND não determinado

Dos 35 pacientes idosos, 20 eram do sexo masculino e 15 do sexo feminino, 71% apresentavam lesões ulceradas em membros inferiores e 29% apresentava lesões em membros superiores. Dos 36 jovens, 23(64%) eram do sexo masculino e 13(36%) do sexo feminino. Nos pacientes jovens além das lesões em membros inferiores e em membros superiores, um paciente apresentava lesão no abdômen e outro em nádegas. Em nenhum dos dois grupos foi documentada lesão seguimento cefálico. Quanto ao diagnóstico, 100% dos pacientes tiveram PCR positivo para *Leishmania braziliensis*.

A comparação entre os dados Demográficos e Clínicos de paciente idosos e jovens é mostrada na tabela 4.

**Tabela 5: Comparação Entre os Achados Demográficos e Clínicos de Pacientes Idosos e Jovens com Leishmaniose Cutânea**

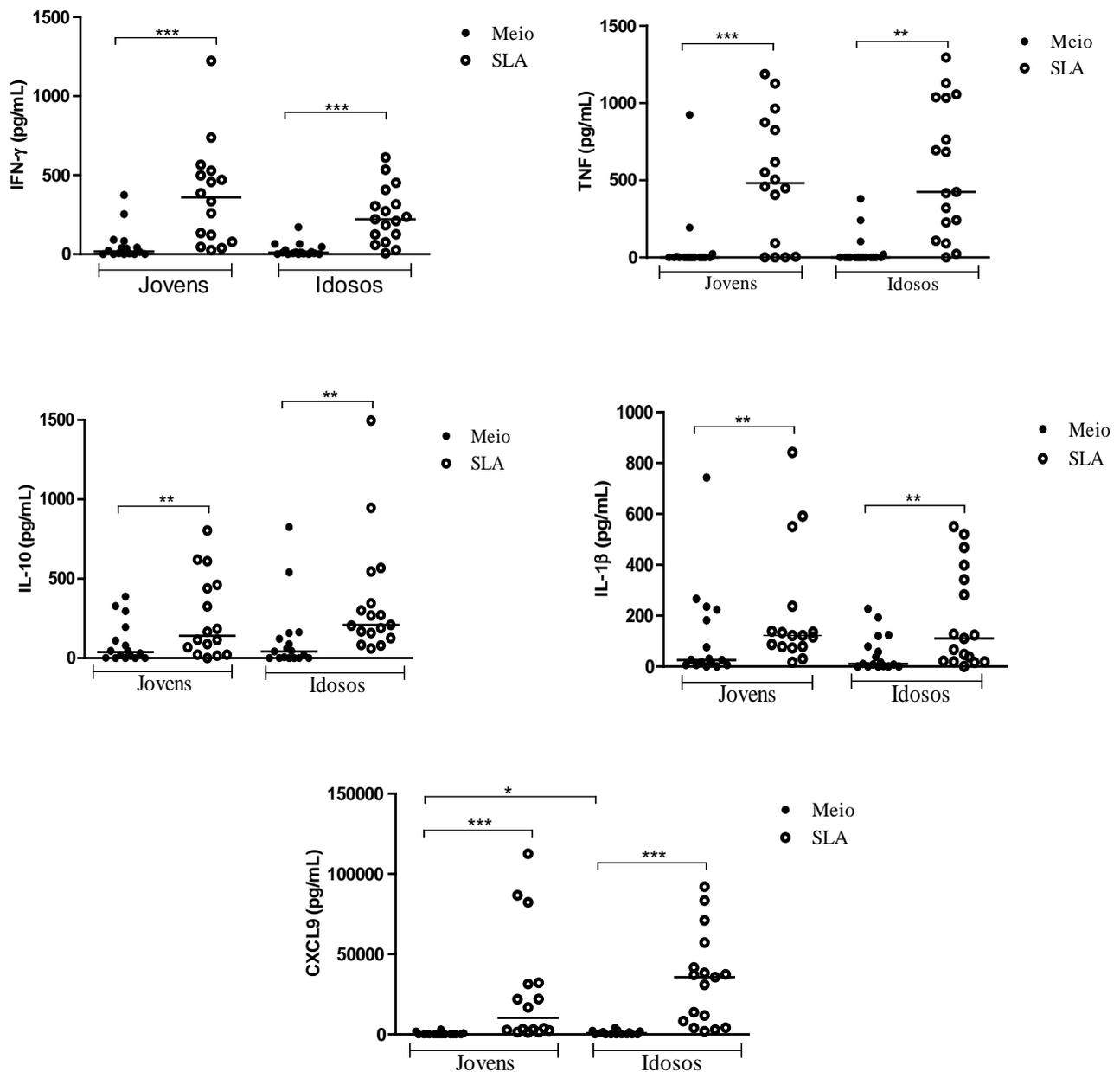
VARIÁVEIS	IDOSOS Nº35	JOVENS Nº36	VALOR P
IDADE (MEDIA±DP)	67±5,2	31±7,9	P<0,0001*
SEXO MASCULINO (%)	20-(57%)	23-(64%)	NS
DURAÇÃO DA DOENÇA (dias)	45±12,07	36±18,21	NS
TOTAL DE LESÕES	45	43	NS
TAMANHO DA MAIOR LESÃO (mm)	20-(26)	19-(26,75)	NS
(%) DE PACIENTES COM LESÕES EM MEMBROS INFERIORES	20-57%	29-81%	NS
LINFADENOPATIA (N) (%)	15-(43%)	31-(86%)	P=0,0002 <sup>‡</sup>
TAMANHO DO LINFONODO (mm)	12±17,2	35±21,1	P <0,0001*
INTRADERMICA REAÇÃO (mm)	16±3,70	17±4,53	NS

Os resultados relacionados com a duração da doença, números de lesões e tamanho da maior lesão estão representados por mediana e interquartil 75%. Teste Exato de Fisher foi utilizado para comparar as proporções. O teste de Mann Whitney foi usado para comparar as demais variáveis. \*DP= desvio padrão

A média de idade no grupo dos idosos foi  $67\pm 5,2$  anos e dos jovens  $31\pm 7,9$  ( $P < 0,0001$ ). Não houve diferença entre os dois grupos com relação à duração da doença, número e tamanho da maior lesão, e entre o número de pacientes com lesão em membros inferiores. A linfadenopatia foi menos frequente nos indivíduos idosos, sendo observada somente em 43% dos casos, enquanto 86% dos jovens tiveram aumento de linfonodo satélite ( $P < 0,005$ ). Também houve diferença entre os dois grupos de pacientes em relação ao tamanho do linfonodo satélite, que foi menor  $12\pm 17,1$ mm entre os idosos do que os jovens  $34\pm 21,2$ mm ( $< 0,0001$ ). Não houve relação entre a ocorrência de linfadenopatia e resposta ou falha a terapia com o antimonial nos 2 grupos. Dos 15 pacientes idosos que apresentavam linfadenopatia seis (40 %) apresentaram falha terapêutica e dos 20 idosos que tinham ausência de linfonodo oito (40%) tiveram falha terapêutica ( $P > 0,05$ ). Embora o diagnóstico inicial de todos os pacientes tenha sido de LC, durante o tratamento, um paciente do grupo de jovens desenvolveu LD e um paciente entre os idosos desenvolveu LM e LD.



**Figura 3 – Produção de IFN- $\gamma$  (A), TNF (B), IL-10 (C), IL-1 $\beta$  (D) e CXCL9 (E) em Sobrenadante de Culturas de Células Mononucleares Estimuladas com Antígeno de *Leishmania* em Pacientes Jovens e Idosos no D 0.**



As CMP de pacientes jovens (n°=15) e idosos (n°=15) foram isoladas através do gradiente de concentração Ficoll-Hypaque e cultivadas em meio de cultura RPM-1640 na presença e ausência de SLA (5 $\mu$ g/mL) durante 72 horas. Os níveis das citocinas e quimicinas foram determinados pela técnica de ELISA e os resultados expressos em pg/mL. A barra central representa a mediana. As análises estatísticas foram realizadas através dos testes de Wilcoxon e Mann Whitney \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

A resposta imune foi estudada no sangue periférico e em tecido da lesão em sete pacientes jovens e idosos. Diferente do observado anteriormente (Carvalho AM *et al.*, 2015) não documentamos no presente estudo menores concentrações de IFN- $\gamma$ , nem maior produção de IL-10 no sobrenadante de células mononucleares de pacientes idosos estimuladas com antígeno de leishmania em relação aos jovens. A capacidade de neutralização de IL-10 em aumentar a produção de IFN-gama e a razão de IFN- $\gamma$ : IL-10 está mostrada na figura 4.

**Figura 4. A Influência da Neutralização da IL-10 na Produção de IFN- $\gamma$  e razão entre IFN- $\gamma$  e IL-10 em Jovens e Idosos**

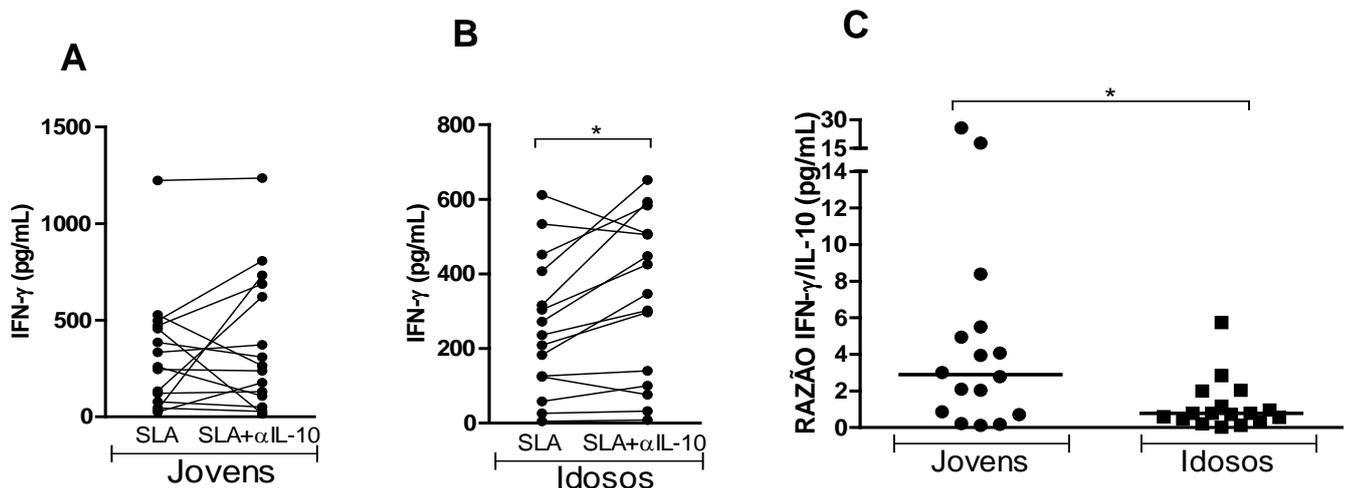


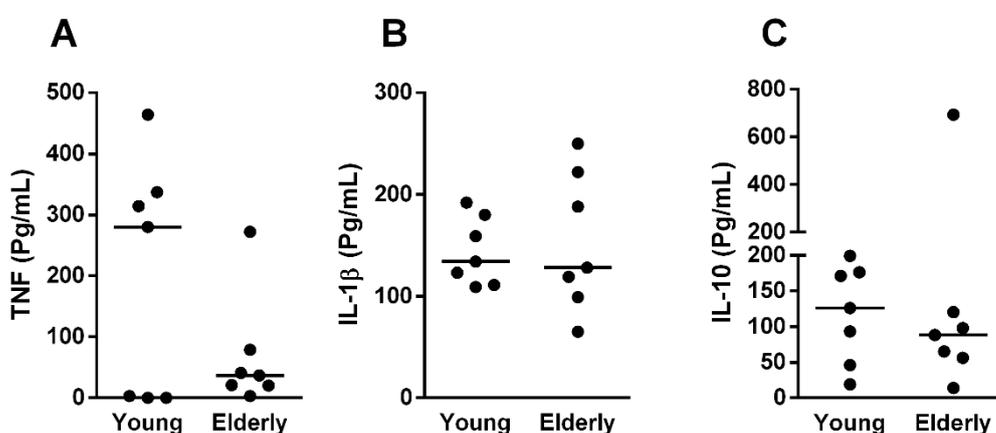
Figura 4 – Produção de IFN- $\gamma$  em sobrenadantes de culturas de pacientes com LC jovens e idosos (A e B) (n=15), a razão entre INF- $\gamma$  e IL-10 (C) entre jovens (n= 13) e idosos (n=15). As análises estatísticas foram realizadas através do teste de Wilcoxon \*p<0,05.

Enquanto a produção de IFN- $\gamma$  por células de pacientes idosos estimuladas com Ag de *leishmania* foi de 236 (5-612 pg/mL) após a neutralização de IL-10 a produção foi de 347 (8-652 pg/mL) (p<0.05). Não houve diferença na concentração de IFN- $\gamma$  mesmo após a neutralização de IL-10 em jovens. (Figura 4). Enquanto no grupo de jovens a neutralização da IL-10 pelo anticorpo monoclonal contra esta citocina não tenha elevado a produção de IFN- $\gamma$ , nos pacientes idosos a neutralização da IL-10 aumentou

significamente a produção de IFN- $\gamma$  (Figura 4). Adicionalmente a razão entre IFN- $\gamma$  e IL 10 foi maior nos pacientes jovens mediana de 2,9 (0,12-25,8 pg/mL) do que nos pacientes idosos 0,77 (0,02-5,7 pg/mL)  $p < 0,05$  (Figura 4).

A produção de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-10 em sobrenadante de biópsia de controles não infectados, de pacientes idosos e de jovens com LC é mostrada na figura 5.

**Figura 5. A Produção de IL-1 $\beta$ , TNF e IFN- $\gamma$  em Sobrenadante de Cultura de Células de Biópsia de Pacientes Jovens e Idosos.**



Nos pacientes jovens a produção de TNF foi de 280(0-464pg/mL) e nos idosos foi de 37 (3-272pg/mL), ( $P >$  que 0.05). Embora não tenha havido diferença na produção de TNF, enquanto valores acima de 200pg/mL só foi documentado em um dos sete pacientes idosos estudados, no grupo de jovens 4 dos 7 pacientes apresentaram produção de TNF acima de 200pg/mL. A produção de IL-1 $\beta$  nos pacientes idosos foi de 128 (65-250pg/mL) e não diferiu da encontrada em jovens 134 (109-192pg/mL). Não documentamos também diferença na produção de IL-10 em cultura de células de biópsia de jovens e idosos.

Todos os pacientes foram tratados com glucantime (Sanofi Aventis), com 20 aplicações na dose de 20mg/Kg peso / dia, administradas por via endovenosa as segundas, quartas e sextas feiras no período de 42 dias. A resposta terapêutica ao antimonial pentavalente nos dois grupos de pacientes é mostrada na tabela 5. A cura foi definida por cicatrização completa da lesão e re-epitelização da pele na ausência de bordas elevadas nos dias 60 e 90 após início do tratamento.

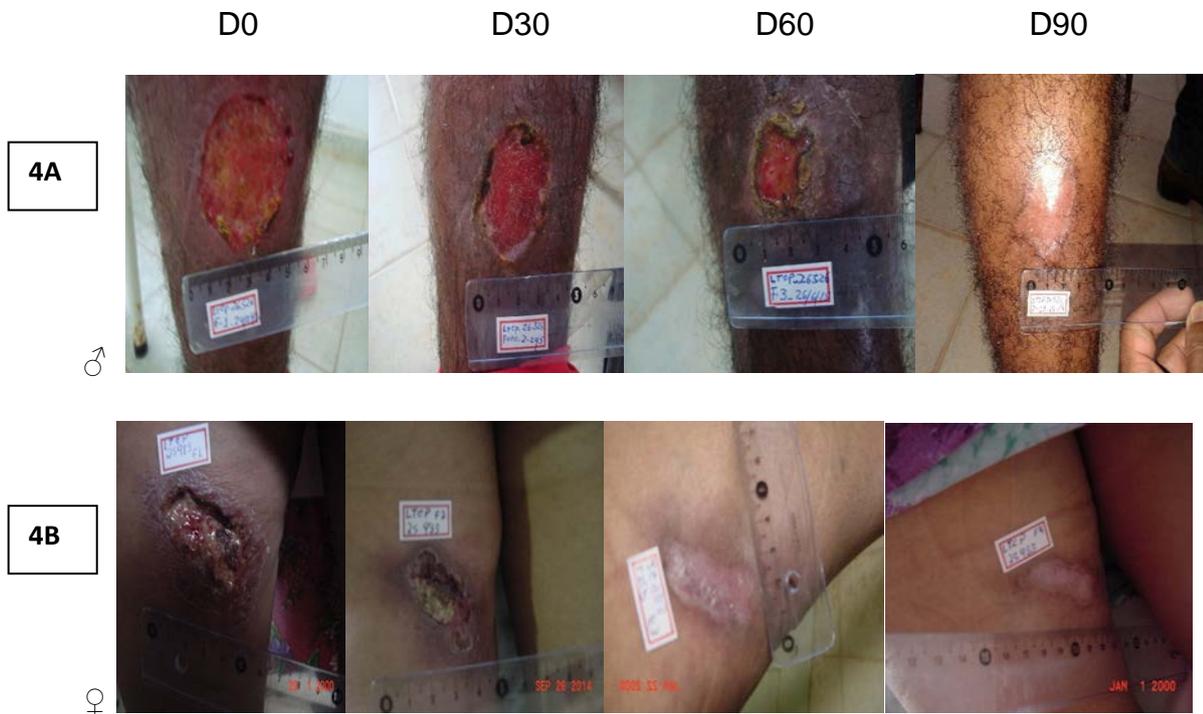
**Tabela 6. Resposta Terapêutica ao Antimonial Pentavalente em Pacientes Idosos e Jovens com Leishmaniose Cutânea na *Leishmania braziliensis***

	IDOSOS (N=35)	JOVENS (N=36)	VALOR P
CURA EM 60 DIAS (%)	12-(34%)	13-(36%)	NS
CURA EM 90 DIAS (%)	07-(20%)	04-(11%)	NS
TOTAL DE CURADOS	22-(63%)	17-(47%)	NS
FALHA TERAPEUTICA AO ANTIMONIAL (%)	13-(37%)	19-(52%)	NS
TEMPO DE CURA (DIAS)	91-(28-246)	121-(47-477)	NS

A frequência de pacientes com cura inicial (60 dias) foi maior nos jovens e cura final (90 dias) foi maior no grupo de idosos do que no grupo de jovens, mas essa diferença não foi estatisticamente significante ( $P>0.05$ ). Não houve diferença também entre o tempo de cura nos dois grupos, embora este tenha sido mais curto nos pacientes idosos.

A figura 6 mostra a evolução de um paciente jovem e de um de paciente idoso que apresentaram cura com 90 dias.

**Figura 6. Evolução de um Paciente Jovem (A) e de um de Paciente Idoso (B) que Apresentaram Cura com 90 dias.**



O tamanho da lesão ulcerada do jovem (30 anos) foi de 40x40mm no dia 0. Houve pequena redução do tamanho no dia 30 (33x30mm) e redução mais significativa no dia 60 (25x20mm). Todavia em todas as 3 avaliações a úlcera estava ativa (A). No paciente idoso (B) a lesão no dia 0 media 55x25mm, no dia 30 foi 36x16mm e no dia 60 a maior parte da lesão já estava cicatrizada, as bordas era planas, mas ainda havia uma pequena área ulcerada. No dia 90 havia cura da lesão nos dois pacientes.

A figura 7 mostra a evolução clínica de dois pacientes que apresentaram falha terapêutica e necessitaram de um segundo curso de antimonial. A evolução clinica foi semelhante nestes pacientes.

**Figuras 7. Evolução de Lesão Ulcerada em um Paciente Idoso e um Jovem que Tiveram Falha Terapêutica ao Antimonial**



O tamanho da lesão ulcerada do idoso (77 anos) era de 20x18mm no dia 0, apresentou discreta redução no dia 30 (20x14mm) e redução mais significativa no dia 60 (tamanho não mensurado), e no dia 90 o tamanho da ulcera era de 14x10mm.

O jovem com idade 37 anos apresentava ulcera com tamanho 30x27mm no dia 0. A úlcera apresentou um leve aumento nos dias 30 e 60 com 30x27 e 30x25mm respectivamente. Só após dia 90 foram observados uma leve redução do tamanho da ulcera 26x22 mm. Todos os dois pacientes tiveram falha terapêutica.

Os principais eventos adversos nos pacientes tratados com glucanteme nos dois grupos de pacientes são mostrados na tabela 6.

**Tabela 7. Principais Eventos Adversos em Pacientes Idosos e Jovens com Leishmaniose Cutânea Tratados com Antimonial Pentavalente**

	IDOSOS ( N=35)	JOVENS ( N=36)	VALOR DE P
ARTRALGIA	09 (26%)	13 (36%)	NS
MIALGIA	09 (26%)	08 (22%)	NS
VÔMITO	04 (11%)	04 (11%)	NS
FEBRE	01 (03%)	06 (17%)	NS
ANORMALIDADES DO ECG ANTES DA TERAPIA	14 (40%)	05 (14%)	P<0.016
ANORMALIDADES DO ECG DURANTE A TERAPIA	19 (54%)	06 (17%)	P<0.0001*
MORTE	01 (3%)	0 (0%)	NS

\* Teste Exato de Fisher

Artralgia e mialgia foram às queixas mais comuns sendo referidas por 26% dos pacientes idosos e 36% dos pacientes jovens, respetivamente. Como era de se esperar mesmo antes do tratamento, alterações eletrocardiográficas foram mais frequentes nos idosos do que nos pacientes jovens. Todavia durante o tratamento enquanto as alterações eletrocardiográficas não se modificaram entre os pacientes jovens, houve um aumento de anormalidades e na gravidade dos achados eletrocardiográficos no grupo de idosos. Neste grupo foi também observado um óbito ocorrido no dia 58, ou seja, cerca de 16 dias após o termino do antimoinial. Este paciente era hipertenso vinha usando losartana potássica e anlodipino 5mg e teve morte súbita por infarto agudo do miocárdio no dia 58 após o inicio do tratamento.

As alterações eletrocardiográficas nos pacientes jovens antes e durante o tratamento com glucantime são mostradas na tabela 7.

**Tabela 8. Principais Anormalidades Eletrocardiográficas Encontrados nos Pacientes Jovens antes e Durante o Tratamento com Antimonial Pentavelnte**

<b>ECG D0</b>	<b>ECG D20</b>
Progressão lenta de onda de V1 a V3	Progressão lenta de R de V1 a V3
Alteração de repolarização ventricular	Alteração da repolarização ventricular
Bradicardia Sinusal	Bradicardia Sinsal
Alteração da repolarização ventricular	Não realizado
Normal	Anormalidade da onda T nas derivações anteriores
Alteração da repolarização ventricular	Distúrbio de condução do ramo direito e extra-sístoles ventriculares

Em 3 pacientes jovens o mesmo achado eletrocardiográfico foi observado antes e durante o tratamento. Em um paciente que teve ECG normal foi observado alterações da onda T nas derivações anteriores e em um paciente foi documentado distúrbio de condução do ramo direito e extra-sístoles ventriculares durante o tratamento.

As alterações eletrocardiográficas no dia 0 e dia 20 do tratamento nos pacientes idosos são mostradas na tabela 8.

**Tabela 9. Principais Anormalidades Eletrocardiográficas Encontradas nos Pacientes Idosos Antes e Durante o Tratamento com Leishmaniose Cutânea Tratados com Antimonial Pentavalente**

ECG D0	ECG D20
Distúrbio de condução	Alteração da repolarização ventricular
Normal	Extra-Sístoles atriais e ventriculares
Arritmia Sinusal	Sobrecarga Ventricular direita
Bloqueio antero superior esquerdo	Bloqueio antero superior esquerdo
Zona inativa em parede inferior	Zona inativa em parede inferior Alteração da repolarização ventricular
Arritmia Sinusal	Distúrbio de condução do ramo direito bloqueio antero superior esquerdo
Normal	Provável sobrecarga ventricular esquerda Alterações de repolarização ventricular
Distúrbio da Repolarização Ventricular	Distúrbio da repolarização ventricular
Normal	Isquemia Anterior. Sobrecarga do Ventrículo Esquerdo
Extra-sístoles Ventriculares	Sobrecarga de Ventrículo. Distúrbio de condução do ramo direito.
Alteração da repolarização em parede ventricular	Progressão anormal de R de V1-V3
Progressão anormal de R de V1-V3	Bloqueio antero -superior esquerdo Bloqueio do Ramo direito do 3º grau
Alteração inespecífica da repolarização ventricular. Extra-sístoles supraventriculares isoladas.	Extra-sístoles supraventriculares isoladas Sinais de sobrecarga ventricular esquerda
Alteração difusa da repolarização ventricular esquerda.	Alteração difusa da repolarização ventricular esquerda
Alteração inespecífica da repolarização ventricular	Alteração inespecífica da repolarização ventricular
Arritmia Sinusal	Distúrbio da repolarização ventricular
Sinais de sobrecarga ventricular esquerda: Alteração de repolarização ventricular em parede inferior	Alteração de repolarização ventricular em parede inferior
Normal	Alteração difusa de repolarização ventricular; Extrassístoles ventriculares isoladas
Normal	Sobrecarga ventricular esquerda: Alteração difusa de repolarização ventricular

Enquanto sobrecarga ventricular esquerda não foi documentada no dia 0 do tratamento em nenhum dos pacientes estudados, durante o tratamento, cinco pacientes (14%) apresentaram sobrecarga ventricular, sendo sobrecarga ventricular esquerda em quatro casos e sobrecarga carga ventricular direita em um paciente. Enquanto extra-sístoles supraventriculares foram documentadas em 1 paciente antes do tratamento, durante o tratamento, um paciente apresentou extra-sístoles atriais e ventriculares e 2 apresentaram extra-sístoles ventriculares. Distúrbio de condução do ramo direito e o bloqueio antero superior esquerdo foram achados frequentes nos idosos durante o tratamento.

## 7. DISCUSSÃO

Espera-se que o número de pessoas com idade acima de 60 anos será maior que o dobro em 2050, aumentando de 901 milhões em 2015 para 2100 bilhões em 2050, e que o número de pessoas acima de 80 anos aumentará de 125.000.000 para 434.000.000 no mesmo período de tempo (United Nations: World population Prospects; <http://esa.un.org/unpd/wp/>). É bem conhecido que o aumento da idade se associa com um número grande de comorbidades incluindo aterosclerose, hipertensão arterial, insuficiência coronariana, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, doenças reumáticas, diabetes mellitus, insuficiência renal, doenças neurológicas e demência entre outras. Com referência às doenças infecciosas sabe-se que o idoso tem mais suscetibilidade a doenças bacterianas e virais as quais também são mais graves no início e nas fases mais avançadas da vida. Todavia com relação as doenças parasitárias, incluindo aí as leishmanioses, estas ocorrem predominantemente na população jovem. A LC acomete predominantemente pacientes do sexo masculino entre os 20 e 40 anos. Entretanto a doença é bem documentada em idosos e na área endêmica onde foi realizado o presente estudo, com o aumento no número total de casos da doença em um período de 20 anos, foi observado que o número de pacientes com leishmaniose com idade acima dos 60 anos duplicou neste período de tempo. (**Jirmanus et al., 2012**). A LC é a forma mais comum das leishmanioses, é documentada em todas as regiões do Brasil e no ano de 2013 foram registrados 18226 casos da doença. Apesar do conhecimento da ocorrência da leishmaniose em adultos com idade avançada e relatos isolados de óbitos em pacientes com LC (**Costa JML et al., 2003**), existe um número pequeno de trabalhos sobre a leishmaniose em pacientes acima dos 60 anos de idade (**Oliveira MC et al., 2005**). No presente estudo pacientes acima de 60 anos com LC

foram comparados com jovens entre 20 e 40 anos com a mesma doença, do ponto de vista clínico, imunológico, com relação ao desenvolvimento de reações adversas e resposta terapêutica. Não foram encontradas diferenças marcantes com relação as características das úlceras nos dois grupos de pacientes, sendo o achado clínico mais importante, a redução na frequência de linfonodo satélite, assim como diminuição do tamanho dos linfonodos entre os idosos. Com relação a resposta imune houve uma diminuição da razão IFN- $\gamma$ : IL-10 entre os idosos, e enquanto o anticorpo monoclonal anti IL-10 elevou significativamente a produção d IFN- $\gamma$  neste grupo, está elevação não foi observada entre os jovens. A resposta terapêutica ao antimonial pentavalente foi também semelhante entre os dois grupos, mas alterações eletrocardiográficas foram mais frequentes e mais graves entre os idosos.

A LTA pode se apresentar sob várias formas clinicas. Na América Latina o principal agente causal da LTA é a *L.braziliensis* que além de causar a LC, causa também a LM e a LD. Mais recentemente formas atípicas com múltiplos nódulos em uma determinada área do corpo ou lesões ulceradas grandes têm sido registradas (**Guimarães LH et al.,2009 e 2017**). Lesões vegetantes têm sido também documentadas, como as associadas com as gestantes (**Morgan DJ et al.,2008**). Com referências a influência da idade na apresentação clínica da doença foi observada aumento do tamanho de úlceras de acordo com o aumento da idade dos pacientes (**Jirmanus et al., 2012**). Em um estudo retrospectivo realizado pelo nosso grupo no qual a média de idade dos idosos foi de  $70\pm 8.2$  anos e a de jovens foi de  $25\pm 2.9$  foi observado que os idosos apresentavam lesões maiores que os jovens. No nosso estudo não observamos diferença no tamanho da lesão entre os dois grupos. Como a idade dos nossos pacientes idosos foi inferior à do trabalho acima relatado e não foram incluídos no estudo pacientes com mais de 60 dias de duração da doença, é possível que estas diferenças possam explicar a

semelhança do menor tamanho da lesão entre jovens e idosos no presente estudo e menor frequência de linfadenopatia. Em concordância com o trabalho de Carvalho 2015, a principal diferença na apresentação clínica entre jovens e idosos no presente trabalho foi a menor frequência de linfadenopatia satélite entre os idosos. O aumento de gânglio linfático satélite é uma característica da LC causada pela *L. braziliensis*. O aumento do linfonodo é um achado comum na fase inicial da doença e pode ser a primeira manifestação da LC. (Barral A *et al*,1995). O mais provável é que este aumento de linfonodo seja devido a migração e proliferação de células T e de células da resposta imune inata neste órgão linfóide o que pode contribuir para a exuberante resposta inflamatória observada na infecção causada pela *L. braziliensis*. Todavia estudos não tem avaliado a existência de uma relação direta entre a presença e tamanho do linfonodo com a exuberância da resposta imune. No presente estudo utilizando a vantagem de termos um número considerável de idosos com e sem linfadenopatia, nós avaliamos, mas não observamos diferença na produção de citocinas inflamatórias como TNF, IFN- $\gamma$ ,IL1B e CXCL9 entre os idosos com e sem linfadenopatia.

Células T são geradas no timo, um órgão linfático primário, que gradativamente diminui com a idade. Este processo é conhecido como involução tímica e é caracterizado pela redução e desaparecimento de compartimentos funcionais tímicos como córtex e medula. O comprometimento do sistema imune nos idosos leva ao aumento da susceptibilidade a infecções, compromete a resposta imune pós-vacinação e aumenta a incidência de outras doenças como osteoporose, câncer e aterosclerose. (Chou, J.P e Effros, RB. *Curr Pharm Des.* **19: 1680 – 1698, 2013**). Com o avanço da idade ocorre diminuição de células CD3, com redução das subpopulações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, mas a alteração mais marcante do ponto de vista quantitativo é o declínio de células T virgens (CD 95<sup>-</sup>) que ocorrem particularmente na subpopulação das linhagens CD8<sup>+</sup> de idosos

(**Sansoni P et al., 2007**). Todavia não são marcantes alterações das funções da célula T como proliferação linfocitária, produção de citocinas associadas com a resposta imune adaptativa e citotoxicidade mediada pelas células CD8<sup>+</sup> na população de idosos.

A resposta imune desempenha um papel fundamental na patogênese das leishmanioses. É sabido que a ativação de macrófagos estimulados pelo IFN- $\gamma$  é o principal mecanismo de defesa contra agentes intracelulares. Também a citotoxicidade mediada por células CD8<sup>+</sup> pode destruir agentes infectantes juntamente com a lise das células infectadas, ou contribuir para destruição dos parasitos por liberá-los no meio extracelular permitindo a sua destruição por outras células. Na ausência de uma resposta Th1 como ocorre na leishmaniose visceral ou na leishmaniose cutânea difusa existem proliferação e disseminação do parasito (**Carvalho EM et al 1996, Barral et al., 1995**). Todavia a existência de uma resposta Th1 não é garantia de controle da infecção. Pacientes com LC e LM tem uma grande produção de IFN- $\gamma$  e TNF, existe capacidade de macrófagos de destruir agentes fagocitados, mas mesmo assim a infecção progride. Adicionalmente existem várias evidências que a lesão tecidual, no caso a úlcera leishmaniótica, é considerada decorrente de uma resposta inflamatória exagerada. Existe uma correlação direta entre a frequência de células CD4<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  e TNF com o tamanho da lesão (**Antonelli et al. 2005**) e embora a resposta citotóxica mediada pela célula CD8<sup>+</sup> seja maior em pacientes com LC do que em controles sadios ou em indivíduos com infecção subclínica, esta resposta não é efetiva na destruição da leishmania (**Santos et al., 2013, Cardoso et al., 2015**). Nestes casos de resposta imune exagerada com agressão tecidual a causa da lesão pode ser uma redução na produção de mecanismos regulatórios ou incapacidade destes de modular a resposta imune. Nas leishmanioses o papel da IL-10, TGF- $\beta$  e da CTLA-4 em modular a resposta imune tem sido bem documentado (**Bacellar O et al., 2002, Carvalho LP et al., 2007**). Todavia enquanto a

diminuição ou incapacidade da IL-10 ou de TGF- $\beta$  de modular a resposta imune contribui para a resposta inflamatória exagerada e dano tecidual, uma produção elevada destas moléculas pode contribuir para redução das defesas do hospedeiro e multiplicação da leishmania (**Barral *et al.*, 1991, Carvalho EM *et al.*,1994, Barral *et al.*,1996**).

Comparando a resposta imune em pacientes jovens e idosos com LTA nós observamos a existência de uma diminuição da produção de IFN- $\gamma$  e um aumento da produção de IL-10 no grupo de idosos (**Carvalho A *et al.*,2015**). Embora no presente estudo nós não tenhamos encontrado dados semelhantes, observamos que a razão de IFN- $\gamma$  :IL-10 foi diminuída nos idosos em relação aos jovens e que enquanto a neutralização da IL-10 não modificou a resposta imune entre os jovens, a neutralização desta citocinas nos idosos foi associada com aumento do IFN- $\gamma$ . A IL-10 é uma citocina moduladora da resposta imune e tem um papel importante na patogênese da leishmaniose visceral e da LC (**Carvalho EM *et al.*,1994, Bacellar O *et al.*,2002, Faria *et al.*, 2005**). A supressão da resposta imune Th1 observada na LV está relacionada com presença da IL-10(**Carvalho *et al.*, 2004**) e a resposta imune exagerada ao antígeno solúvel de leishmania observada na LC e na LM deve-se em parte a incapacidade da IL-10 de modular de modo eficaz a resposta imune em pacientes com LC e LM. Enquanto em células indivíduos sadios responsivos ao PPD, a IL-10 reduz em cerca de 84% a produção de IFN- $\gamma$ , em células de pacientes com LC e LM, a adição da IL-10 à culturas estimuladas com antígeno de leishmania reduziu em 44% e 19% a produção de IFN- $\gamma$ , respectivamente (**Bacellar O *et al.*,2002**). Este defeito na modulação da resposta imune pode estar relacionado com uma diminuição do número e da intensidade de expressão dos receptores da IL-10 (**Faria *et al.*,2005**). No presente estudo a produção de IL-10 foi semelhante em jovens e idosos, mas enquanto esta citocina teve um papel na regulação

da resposta imune nos idosos, o mesmo não foi observado com jovens sugerindo que a resposta inflamatória possa ser mais atenuada nos idosos. Como no presente estudo, exceto pela linfadenopatia, não houve diferença na apresentação clínica da LC e nem na resposta terapêutica entre os idosos e jovens, a conclusão é que a idade não modificou de modo significativo a resposta imune adaptativa a ponto de interferir nas manifestações clínicas e na resposta ao tratamento.

As vacinas são as formas mais eficazes de prevenção contra doenças infecciosas e têm sido aplicadas em grande escala em crianças e mais recentemente em idosos. A observação de que a produção de anticorpos, após vacinação contra Influenza é quatro vezes menor em idosos do que em adultos jovens (**Goodwin, K et al., 2006**) sugere uma redução na capacidade de idosos de produzir anticorpos que pode ser relacionada com um defeito ou na cooperação celular entre células T e B. Nós não comparamos no presente estudo a produção de anticorpos entre jovens e idosos, mas como não existe evidência de participação de anticorpos na patogênese das leishmaniose, o esperado é que a produção destas moléculas não se associe com a apresentação clínica da doença.

Alterações da resposta imune inata tem também sido documentadas em idosos como redução da capacidade de fagocitar partículas ou patógenos opsonizados, redução no número de monócitos clássicos e aumento na frequência de monócitos intermediários e não clássicos, e redução no número de células de Langerhans (**Pintí M et al., 2016**).

Interessante, enquanto mecanismos de defesa estão diminuídos com o envelhecimento, ocorre um aumento da resposta inflamatória nesta população, com elevação da produção de citocinas pró-inflamatórias tanto do tipo 1 Th1 (IL-2, TNF, IFN $\gamma$ ) como Th2 (IL-4, IL-6) principalmente produzidas por células CD8<sup>+</sup> (**Sansoni, P et al, 2008**). É também elevada a produção de quimiocinas inflamatórias e proteínas da fase aguda da

inflamação, como a molécula celular de adesão vascular I (VCAM-1) e a proteína C reativa. (Chou, J.P *et al*,2013). No presente estudo nós não encontramos diferença na produção de 3 importantes proteínas pró-inflamatórias, a IL- $\beta$ , o TNF e a IFN- $\gamma$  em idosos, em células do sangue periférico como em células da lesão.

Os antimoniais têm sido utilizados no tratamento da leishmaniose por mais de 100 anos (Deps PD, Viana MC *et al*,2000). O Sb trivalente (Sb III), tártaro emético, foi introduzido no Brasil por Gaspar Vianna em 1912. Sob a forma de antimonial pentavalente esta droga vem sendo usada desde 1945 para o tratamento das leishmanioses e é a droga de primeira escolha no Brasil para tratamento das leishmanioses, sendo distribuída gratuitamente pelo governo. Há comercialmente o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime), na América Latina e África, e o estibogluconato de sódio (Pentostam), nos Estado Unidos, Europa e Índia. Ambos têm resultados semelhantes nas formas clínicas da LTA. Maior toxicidade com o SGS importado da China foi observado no nosso país (Deps PD, Viana MC *et al*,2000,Lima ED *te al*,2007). As principais limitações para o uso do antimonial no Brasil dizem respeito ao uso parenteral da medicação e a ocorrência de reações adversas. Todavia mais recentemente falha terapêutica ao antimonial tem sido encontrada em algumas regiões do Brasil, assim como a resposta limitada observada nas infecções causadas pela *L. braziliensis* (Machado *et al*,2012, Romero GA *et al*,2001, Prates FV *et al*,2016). Em um ensaio clínico realizado em pacientes com leishmaniose cutânea proveniente de duas áreas endêmicas do Brasil infectados por *L.braziliensis* ou por *L. (V.) guyanensis* foi avaliado a resposta terapêutica ao antimonial pentavalente (SbV) na dose de 20mg/ kg/dia administrado por via intravenosa ou intramuscular durante 20 dias. Foram incluídos 52 pacientes infectados com *L.braziliensis* e 49 pacientes infectados com *L. guyanensis*, e estes regularmente tratados e acompanhados

por seis meses. Foi observada falha terapêutica em (49,2%) no grupo com *L.braziliensis* e 74,7% no grupo com *L. guyanensis* com risco relativo de falha no grupo infectado *L.braziliensis* de 1,5 e no *L. guyanensis* de 1,7. Foi concluído que as diferenças entre espécies de leishmania desempenham um papel importante no desfecho da leishmaniose cutânea tratada com o antimonial pentavalente (**Romero GA et al,2001**). Todavia a resposta terapêutica é também influenciada pelo local onde se realiza o estudo. Em pacientes com LC no Peru a falha ao tratamento com antimonial após 12 meses de seguimento foi 30,4% em pacientes infectados com a *L.braziliensis*, 24,05% em pacientes com *L. peruviana* e em 8,3% em pacientes infectados com *L. guyanensis*. A infecção por *L. guyanensis* foi associado com menor risco de falha terapêutica ( *odds ratio*, 0.07(95% de intervalo de confiança, . 007-,8);*P*=0.3). (**Arevalo J et al.,2007**).

A pentamidina é uma droga utilizada no tratamento da LC e tem sido mais utilizada em pacientes infectados com *L. guyanensis* (**Vries et al, 2015; Neves et al, 2011; Andersen et al, 2005**). No entanto, estudos recentes em Manaus mostraram uma eficácia de apenas 50-60%, da pentamidina. Uma taxa de eficácia mais baixa foi também encontrada no Peru em pacientes com infecção por *L. braziliensis* (**VrieS HJ et al, 2015; Neves et al, 2011; Andersen et al, 2005**).

Pacientes com LC causada por *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum* ou *L. aethiopica* têm sido tratados com a Anfotericina B na sua forma lipossomal, com menor toxicidade associada ao tratamento, menor duração do tratamento e do tempo de hospitalização, além de taxa de cura mais elevada, em torno de 80-90% (**Minodier & Parola, 2007; Solomon et al, 2007, 2013; Wortmann et al, 2010**). No entanto, estes dados são de relatos de caso e séries de casos, com pequeno número de pacientes. Assim, mais estudos prospectivos controlados e randomizados são necessários para o

estabelecimento do melhor regime terapêutico da anfotericina B lipossomal e do seu real custo-benefício no tratamento da LC. Afinal o alto custo desta medicação é o principal fator limitante para o tratamento com essa droga.

Em um estudo realizado no Brasil em pacientes com LC causada por *L. braziliensis* foi avaliado o uso do Fluconazol em doses diárias variando de 5-8mg/kg/dia até cicatrização total das lesões cutâneas. As taxas de cura variaram entre 75% a 100%, de acordo com a dose utilizada (Souza et al, 2011). Este estudo, entretanto, foi um estudo aberto utilizando doses elevadas de fluconazol por um longo período de tempo. Mais recentemente a eficácia desta droga no tratamento da LC foi avaliada em um estudo randomizado e controlado comparando o fluconazol na dose de 6,5-8,0mg/Kg/peso por 28 dias com o glucantime na dose de 20mg/Kg/peso por 20 dias. Foi observada uma alta falha terapêutica 76.81% no grupo com fluconazol. (**Prates F V et al,2016**).

Como a resposta imune é exagerada na LTA a associação de drogas leishmanicidas com agentes imunomoduladores como a pentoxifilina e o GM-CSF têm sido mais eficazes no tratamento da LC e da LM do que o antimonial isoladamente (**Brito et al.,2004, Lessa et al,2001, Machado et al, 2007**). Todavia em um ensaio clínico recente a associação de glucantime como a pentoxifilina mostrou eficácia semelhante ao antimonial isoladamente no tratamento da LC. (**Britto MG et al,2016**)

Estudos controlados e randomizados avaliando a resposta terapêutica ao antimonial ou a outras drogas na LC em pacientes idosos são inexistentes. Em uma coorte histórica com 151 pacientes com idade variando de 1 a 60 anos, foram avaliados os fatores de risco associados ao insucesso do tratamento com o antimoniato de meglumina administrado na dose aproximadamente de 13 mg/kg/peso dia. Com base em uma análise multivariada o peso maior que 68 kg (RR=4,3), o número de lesões maior que

3(RR=4,6), tratamento irregular (RR=12,5) e história de tratamento anterior para LTA (RR=4,5) foram associados com insucesso no tratamento(Rodrigues AM *et al.*,2006). Não houve diferença a falha terapêutica entre jovens e idosos, mais somente 7 pacientes idosos foram incluídos neste estudo, o que limita se tirar conclusões sobre a influência da idade na resposta ao tratamento. No presente trabalho nós não observamos diferença na resposta terapêutica ao antimoniató de meglumina entre jovens e idosos assim como no tempo de cura da doença, embora este tempo tenha sido mais prolongado nos jovens, mas sem significância estatística.

As reações adversas mais frequentes no tratamento de LC com glucanteme são artralgia, mialgia, inapetência, cefaléia, febre, vômitos, tontura e edema no local da aplicação. (Gontijo B *et al.*2003, Diniz DS *te al.*,2012). Em um estudo com 40 pacientes as reações mais frequentes foram artralgia (42,5%), mialgia (37,5%), inapetência (25%), arritmias (17,5%) e febre 12,5%). Em relação ao gênero, 92,9% das mulheres tiveram reações adversas em comparação com 53,8% dos homens. (Diniz DS *te al.*,2012). Reações adversas graves ocorrem com mais frequência em pacientes com leishmaniose visceral principalmente com idade igual ou superior a 50 anos. Em 13 pacientes com leishmaniose visceral com reações adversas graves, insuficiência renal ocorreu em 8 casos, pancreatite em seis casos e insuficiência hepática e/ou hepatite em cinco pacientes (Oliveira AL *et al.*, 2009). No presente estudos a despeito dos pacientes terem mais que 60 anos de idade a frequência destas reações foi menor do que a reportada em outros estudos (Prates FV *et al.*, 2016). Como habitualmente reações adversas às drogas são mais frequentes em idosos, é possível que utilização do antimonial as segundas, quartas e sextas feiras em vez de diariamente, tenha contribuído para a redução da frequência das reações adversas.

Diferente do observado por Paula et al., 2003 e Saldanha. et al 2000 que demonstraram alterações bioquímicas nos exames laboratoriais em 42% do pacientes idosos, o nosso estudo mostrou que não houve diferença significativa no hemograma, dosagem de eletrólitos, transaminases, ureia, creatinina e glicemia. É possível que o tratamento em dias alternados possa ter influenciado e reduzido as alterações bioquímicas encontradas durante o tratamento da LC com as alterações encontradas em outros estudos.

Em um estudo no qual alterações eletrocardiográficas foram avaliadas em 59 pacientes quenianos sendo 56 com leishmaniose visceral e 3 leishmanioses cutânea, foi demonstrado que anormalidades no ECG aumentaram com a dose de antimonial, sendo observadas em 52% dos pacientes tratado com 10 mg de Sb/Kg/dia e em 100% dos casos tratados com 40mg de Sb/Kg/dia (**Chulay JD et al, 1985**). Pacientes com LC tratado com antimoniato de meglunina 11(27%) apresentaram alterações eletrocardiográficas durante o uso de N-metil-glucamina, sendo dez caracterizadas por distúrbios de repolarização ventricular e um paciente apresentou taquicardia sinusal (**Paula C D et al,2003**). **Ribeiro AL et al** não observaram diferenças significativas nas variáveis qualitativas do ECG antes e após o tratamento com antimonial pentavalente.

Em um estudo com 131 pacientes portadores de LC tratados com glucantime, as alterações mais comuns foram o intervalo QT prolongado, que foi observado em 19% dos pacientes e depressão de seguimento ST que ocorreu em 6,1% dos casos. No presente estudo, além da elevada frequência de alterações eletrocardiográficos no grupo de idosos, foram observadas também anormalidades não previamente relatadas como sobrecarga ventricular e extra sístole ventriculares. Embora estudos eletrocardiográficos não sejam feitos após o tratamento para avaliar se houve desaparecimento destas

alterações as amoralidades encontradas são graves e contraindicam o uso desta droga em pacientes idosos.

## 8. CONCLUSÕES:

- A apresentação da leishmaniose cutânea em idosos se diferencia da observada em jovens pela menor frequência e menor tamanho da linfadenopatia satélite.
- A produção de citocinas inflamatórias por células do sangue periférico e da lesão é similar entre jovens e idosos, mas a menor razão IFN- $\gamma$ /IL-10 e a elevação da produção de IFN- $\gamma$  após neutralização da IL-10 em idosos indica que a resposta imune é mais apropriadamente modulada neste grupo de pacientes.
- A ausência de diferença na resposta terapêutica entre jovens e idosos e a falta de relação entre a resposta imune e a presença e tamanho do linfonodo satélite com a resposta terapêutica sugere que fatores relacionados ao parasita ao invés de fatores do hospedeiro estejam mais relacionados com a resposta terapêutica.
- A aplicação do antimonial pentavalente às 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> feiras ao invés do uso diário pode ter contribuído para a baixa frequência e ausência de diferença nas reações adversas associadas aos aspectos clínicos como artralgia, mialgia, náuseas e vômitos entre idosos e jovens.
- A elevada frequência e gravidade das alterações eletrocardiográficas em pacientes idosos respalda o uso de drogas alternativas como a anfotericina B liposomal no tratamento da leishmaniose cutânea em pacientes idosos.

## 9. REFERÊNCIAS

- 1- Almeida RP, Brito J, Machado PL, DE Jesus AR, Schriefer A, Guimarães LH, Carvalho EM. Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. *Am J Trop Med Hyg.* 73(1):79-81, **2005**.
- 2- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *journal.pone.* 7(5):e35671, **2012**.
- 3- Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett.* 15; 101(2):226-30, **2005**.
- 4- Arana B, Rizzo N, Diaz A. Chemotherapy of cutaneous leishmaniasis: a review. *Med Microbiol Immunol.* 190(1-2):93-5, **2001**.
- 5- Arevalo J, Ramirez L, Adauí V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, De Doncker S, Maurer A, Chappuis F, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis.* 195(12):1846-51, **2007**.
- 6- Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* 70(12):6734-40, **2002**.
- 7- Bailey MS, Lockwood DN. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 25(2):203-11, **2007**.
- 8- Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int J Dermatol.* 34(7):474-9, **1995**.
- 9- Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 53(3):256-9, **1995**.
- 10- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg.* 44(5):536-46, **1991**.
- 11- Barral-Netto M, Badaró R, Barral A, Carvalho EM. Immunology of cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 19(3):173-91, **1986**.

- 12- Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102(5):625-30, **2007**.
- 13- Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 84(2):188-94, **1996**.
- 14- Camargo Ferreira E, Vasconcelos E, de Oliveira Schubach A, Valette-Rosalino CM, de Souza Coutinho R, Conceição-Silva F, de Matos Salgueiro M, Rosandiski Lyra M, Soares Moreira J, Azeredo-Coutinho RB, Fernandes Pimentel MI, Roberto Mortari S, de Fátima Madeira M, Pereira Quintella L, Baptista C, de Almeida Marzochi MC. American tegumentary leishmaniasis in older adults: 44 cases treated with an intermittent low-dose antimonial schedule in Rio de Janeiro, Brazil. *J Am Geriatr Soc*. 58(3):614-6, **2010**.
- 15- Cardoso TM, Machado Á, Costa DL, Carvalho LP, Queiroz A, Machado P, Scott P, Carvalho EM, Bacellar O. Protective and pathological functions of CD8+ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. *Infect Immun*. 83(3):898-906, **2015**.
- 16- Carneiro PP, Conceição J, Macedo M, Magalhães V, Carvalho EM, Bacellar O. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Journal. Pone*, 11(2):e0148084, **2016**.
- 17- Carvalho AM, Amorim CF, Barbosa JL, Lago AS, Carvalho EM. Age modifies the immunologic response and clinical presentation of American tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 92(6):1173-7, **2015**.
- 18- Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol*. 15; 152(12):5949-56, **1994**.
- 19- Costa JM, Garcia AM, Rêbello JM, Guimarães KM, Guimarães RM, Nunes PM. Fatal case during treatment of American tegumentary leishmaniasis with sodium stibogluconate bp 88 (shandong xinhua)]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 36(2):295-8, **2003**.
- 20- Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil--mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102(2):149-53, **2007**.
- 21- Chou JP, Effros RB. T cell replicative senescence in human aging. *Curr Pharm Des*. 19(9):1680-98, **2013**.

- 22 Chou JP, Ramirez CM, Ryba DM, Koduri MP, Effros RB. Prostaglandin E2 promotes features of replicative senescence in chronically activated human CD8+ T cells. *Journal Pone* 11; 9(6):e99432, **2014**.
- 23-Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, de Oliveira Penna G, Lima Machado PR, Talhari S. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 84(2):255-60, **2011**.
- 24- Chulay JD, Spencer HC, Mugambi M. Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). *Am J Trop Med Hyg.* 34(4):702-9, **1985**.
- 25- Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 123(3):399-410, **2006**.
- 26- Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol.* 149(3-4):139-46, **2007**.
- 27- Deps PD, Viana MC, Falqueto A, Dietze R. [Comparative assessment of the efficacy and toxicity of N-methyl-glucamine and BP88 sodium stibogluconate in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 33(6):535-43, **2000**.
- 28- Desjeux P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat Q.* 45(2-3):267-75, **1992**.
- 29- Diniz DS, Costa AS, Escalda PM. The effect of age on the frequency of adverse reactions caused by antimony in the treatment of American tegumentary leishmaniasis in Governador Valadares, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 45(5):597-600, **2012**.
- 30- Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J, Jr, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, de Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO. A diminuição da expressão in situ do receptor de interleucina-10 está correlacionada com as respostas inflamatórias e citotóxicas exacerbadas observadas na leishmaniose mucosa. *Infect Immun.* 73(12): 7853-9, **2005**.
- 31- Furtado T. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Machado-Pinto J(ed), Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, p.319-328, **1994**.
- 32- Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Wilber Quispe Tintaya K, Dujardin JC. Culture-independent species typing of

neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *Clin Microbiol.* 42(5):2294-7, **2004** .

33- Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho LP, Delavechia T, Carvalho EM, Bacellar O. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis.* 29;12:75, **2012**.

34- Goodwin K., Viboud, C e Simonses, L., Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. *Vaccine.* 24: 1159-1169, **2006**.

35- Gontijo B, de Carvalho Mde L. [American cutaneous leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36(1):71-80, **2003**.

36- González U1, Pinart M, Rengifo-Pardo M, Macaya A, Alvar J, Tweed JA. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. - *Cochrane Database Syst Rev.* 15;(2):CD004834, **2009** .

37- Guimarães LH, Queiroz A, Silva JA, Silva SC, Magalhães V, Lago EL, Machado PR, Bacellar O, Wilson ME, Beverley SM, Carvalho EM, Schriefer A. Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania braziliensis*: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis.* 1;10(12):e0005100, **2016**.

38- Guimarães LH, Machado PR, Lago EL, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Carvalho EM. 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):712-5, **2009**.

39- Heinzl FP, Sadick MD, Mutha SS, Locksley RM. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;88(16):7011-5, **1991**.

40- Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, Carvalho EM. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg.* 86(3):426-33, **2012**.

41- Jones TC, Johnson WD Jr, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF, et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis.* 156(1):73-83, **1987**.

42- Killick Kendrick R, Rioux JA. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. *Ann Parasitol Hum Comp.* 66 Suppl 1:71-4, **1991** .

43- Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 77(5):569-96, **1983** .

- 44- Leopoldo PT1, Machado PR, Almeida RP, Schriefer A, Giudice A, de Jesus AR, Ho JL, Guimarães LH, Bacellar O, Carvalho EM. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC Infect Dis.* 25;6:75, **2006** .
- 45- Lessa HA1, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho EM. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *m J Trop Med Hyg.* 65(2):87-9, **2001**.
- 46- Lessa HA, Lessa MM, Guimarães LH, Lima CM, Arruda S, Machado PR, Carvalho EM. A proposed new clinical staging system for patients with mucosal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 106(6):376-81, **2012**.
- 47- Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Braz J Otorhinolaryngol.* 73(6):843-7, **2007**.
- 48- Liew FY, Xu D, Chan WL. Immune effector mechanism in parasitic infections. *Immunol Lett.* 65(1-2):101-4, **1999**.
- 49- Machado PR, Lessa H, Lessa M, Guimarães LH, Bang H, Ho JL, Carvalho EM. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 15;44(6):788-93, **2007**.
- 50- Machado PR, Rosa ME, Costa D, Mignac M, Silva JS, Schriefer A, Teixeira MM, Bacellar O, Carvalho EM. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 105(8):438-44, **2011** .
- 51- Machado PR, Rosa ME, Guimarães LH, Prates FV, Queiroz A, Schriefer A, Carvalho EM. reatment of Disseminated Leishmaniasis With Liposomal Amphotericin B. *Clin Infect Dis.* 15;61(6):945-9, **2015**.
- 52- Machado P, Araújo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Bittencourt A, Carvalho EM. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin Infect Dis.* 15;34(12):E69-73, **2002** .
- 53- Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, Sousa RS, Talhari A, Penna G, Carvalho EM. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis.* 21;4(12):e912, **2010**.
- 54- Machado PR, Rosa ME, Guimarães LH, Prates FV, Queiroz A, Schriefer A, Carvalho EM. Tratamento da Leishmaniose Disseminada com Anfotericina Lipossomal B. *Clin Infect Dis.* . 61 (6): 945-9, **2015**.

- 55- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2nd ed. Editora do Ministério de Saúde, Brasília, Brazil: **2010**.
- 56- Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis.* 5(3):150-8, **2007**.
- 57- Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Goncalves M, Reis MG, Carvalho L, Fernandes O, Barral-Netto M, Barral A. Frequency of infection of *Lutzomyia phlebotomines* with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97(2):185-8, **2002**.
- 58- Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology.* 137(8):1159-68, **2010**.
- 59- Morgan DJ, Guimaraes LH, Machado PR, D'Oliveira A Jr, Almeida RP, Lago EL, Faria DR, Tafuri WL, Dutra WO, Carvalho EM. Cutaneous leishmaniasis during pregnancy: exuberant lesions and potential fetal complications. *Clin Infect Dis.* 15;45(4):478-82, **2007**.
- 60- Muniz AC, Bacellar O, Lago EL, Carvalho AM, Carneiro PP, Guimarães LH, Rocha PN, Carvalho LP, Glesby M, Carvalho EM. Immunologic Markers of Protection in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection: A 5-Year Cohort Study. *J Infect Dis.* 15;214(4):570-6, **2016**.
- 61- Oliveira MC, Amorim RF, Freitas Rde A, Costa Ade L. A fatal case of mucocutaneous leishmaniasis after pentavalent antimonial use]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38(3):258-60, **2005**.
- 62- Neves LO, Talhari AC, Gadelha EP, Silva Júnior RM, Guerra JA, Ferreira LC, Talhari S. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol.* 86(6):1092-101, **2011**.
- 63- O'Neal SE, Guimarães LH, Machado PR, Alcântara L, Morgan DJ, Passos S, Glesby MJ, Carvalho EM. Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1;195(1):142-8, **2007**.
- 64- Paula CD, Sampaio JH, Cardoso DR, Sampaio RN. A comparative study between the efficacy of pentamidine isothionate given in three doses for one week and N-methylglucamine in a dose of 20mgSbV/day for 20 days to treat cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36(3):365-71, **2003**.

- 65- Pinti M, Appay V, Campisi J, Frasca D, Fülöp T, Sauce D, Larbi A, Weinberger B, Cossarizza A. Aging of the immune system: Focus on inflammation and vaccination. *Eur J Immunol.* 46(10):2286-2301, **2016**.
- 66- Prates FV, Dourado ME, Silva SC, Schriefer A, Guimarães LH1, Brito MD, Almeida J, Carvalho EM, Machado PR, Fluconazole in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*: A Randomized Controlled Trial. *Clin Infect Dis.* 1;64(1):67-71, **2017**.
- 67- Queiroz A, Sousa R, Heine C, Cardoso M, Guimarães LH, Machado PR, Carvalho EM, Riley LW, Wilson ME, Schriefer A. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain polymorphisms. *J Clin Microbiol.* 50(12):4028-34, **2012**.
- 68- Reed SG, Badaró R, Masur H, Carvalho EM, Lorencó R, Lisboa A, Teixeira R, Johnson WD Jr, Jones TC. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 35(1):79-85, **1986**.
- 69- Reveiz L, Maia-Elkhoury AN, Nicholls RS, Romero GA, Yadon ZE. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. *PLoS One.* 29;8(4):e61843, **2013**.
- 70- Ribeiro AL, Drummond JB, Volpini AC, Andrade AC, Passos VM. Electrocardiographic changes during low-dose, short-term therapy of cutaneous leishmaniasis with the pentavalent antimonial meglumine. *Braz J Med Biol Res.* 32(3):297-301, **1999**.
- 71- Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J Infect Dis.* 15;193 (10):1375-83, **2006**.
- 72- Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macêdo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg.* 65(5):456-65, **2001**.
- 73- Sadeghian G, Ziaei H, Sadeghi M. Electrocardiographic changes in patients with cutaneous leishmaniasis treated with systemic glucantime. *Ann Acad Med Singapore.* 37(11):916-8, **2008**.
- 74- Saldanha AC, Romero GA, Guerra C, Merchan-Hamann E, Macedo Vde O. Comparative study between sodium stibogluconate BP 88 and meglumine antimoniate in cutaneous leishmaniasis treatment. II. Biochemical and cardiac toxicity. *Rev Soc Bras Med Trop.* 33(4):383-8, **2000**.

- 75- Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biasini C, Zanni F, Zanlari L, Telera A, Lucchini G, Passeri G, Monti D, Franceschi C, Passeri M. The immune system in extreme longevity. *Exp Gerontol.* 43(2):61-5, **2008**.
- 76- Silva Santos C, Brodskyn CI. The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Front Public Health.* 29;2:165, **2014**.
- 77- Santos JB, de Jesus AR, Machado PR, Magalhães A, Salgado K, Carvalho EM, Almeida RP. Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous Leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis.* 15;190(10):1793-6, **2004**.
- 78- Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, De Souza AA, Ishikawa EA, Braga RR. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 85(6):735-8, **1991**.
- 79- Sistema de Informação de Agravos de Notificação. SINAN. 2016. <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>
- 80- Solomon M, Baum S, Barzilai A, Scope A, Trau H, Schwartz E. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to *Leishmania braziliensis*. *J Am Acad Dermatol.* 56(4):612-6, **2007**.
- 81- Sousa AQ, Frutuoso MS, Moraes EA, Pearson RD, Pompeu MM. High-dose oral fluconazole therapy effective for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Vianna) braziliensis*. *Clin Infect Dis.* 53(7):693-5, **2011**.
- 82- Sundar S, Sinha P, Jha TK, Chakravarty J, Rai M, Kumar N, Pandey K, Narain MK, Verma N, Das VN, Das P, Berman J, Arana B. Oral miltefosine for Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis: a randomised trial. *Trop Med Int Health.* 18(1):96-100, **2013**.
- 83- Schriefer A, Schriefer AL, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun.* 72(1):508-14, **2004**.
- 84- Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med.* 1;168(5):1675-84, **1988**.

85- Turetz ML1, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 15;186(12):1829-34, **2002**.

86- Unger A, O'Neal S, Machado PR, Guimarães LH, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Glesby MJ, Carvalho EM. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 80(4):574-9, **2009**.

87- Walton BC. Evaluation of chemotherapy of American leishmaniasis by the indirect fluorescent antibody test. *Am J Trop Med Hyg.* 29(5):747-52, **1980**.

88- Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, Haque R, Schriefer A, Talhari S, Carvalho EM, Donelson JE, Wilson ME. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol.* 49(11):3892-904, **2011**.

89- Wortmann G, Zapor M, Ressler R, Fraser S, Hartzell J, Pierson J, Weintrob A, Magill A. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 83(5):1028-33, **2010**.

90- World Health Organization. Health statistics and health information systems <http://www.who.int/healthinfo/survey/ageingdefnolder/en/index.html>.



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



# Posto de Saúde de Corte de Pedra

---

COLETA DE DADOS: ESTUDO PROSPECTIVO AVALIANDO ASPECTOS CLÍNICOS, IMUNOLÓGICOS E TERAPÊUTICOS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM IDOSOS.

Nº do LTCP: \_\_\_\_\_

Datas das Visitas

01: \_\_\_\_\_

02: \_\_\_\_\_

03: \_\_\_\_\_

04: \_\_\_\_\_

05: \_\_\_\_\_

VISITA 01

Data: \_\_\_\_\_

**Identificação**

1. N° do LTCP ( \_\_\_\_\_ )  
2. Nome: \_\_\_\_\_  
3. Idade: \_\_\_\_\_ 4. Sexo: ( ) F ( ) M 5. Cor: \_\_\_\_\_

**Exame Médico :**

6. Dados Complementares:  
a. Glicemia: \_\_\_\_\_  
b. IDRM: \_\_\_\_\_  
c. Pressão Arterial: \_\_\_\_\_
7. Comorbidades ..... Diabete ( ) Sim ( ) Não Hipertensão ( ) Sim ( ) Não
8. Sintomas Associados:  
Febre ..... ( ) Sim ( ) Não  
Calafrio ..... ( ) Sim ( ) Não  
Dor (no local) ..... ( ) Sim ( ) Não  
Artralgia ..... ( ) Sim ( ) Não  
Mialgia ..... ( ) Sim ( ) Não  
Outro(s) \_\_\_\_\_
9. Número total de lesões de pele..... ( \_\_\_\_\_ )  
10. Tempo de duração da lesão ativa ..... ( \_\_\_\_\_ )  
11. Número e tipo de lesão:  
a. Icerada..... ( ) Não ( ) Sim  
b. xulcerarção..... ( ) Não ( ) Sim  
c. ápula ..... ( ) Não ( ) Sim  
d. ápula com exulceração ..... ( ) Não ( ) Sim  
e. Nódulo ..... ( ) Não ( ) Sim  
f. ódulo com exulceração ..... ( ) Não ( ) Sim

**Lesão principal**

12. Local da maior lesão (marque apenas UM):  
( ) Cabeça ( ) Face ( ) Pescoço ( ) Tronco ( ) Braço D ( ) Braço E ( ) Antebraço D  
( ) Antebraço E ( ) Coxa D ( ) Coxa E ( ) Perna D ( ) Perna E ( )  
Outro: \_\_\_\_\_
13. Tamanho da maior lesão (mm): ..... ( \_\_\_\_\_ x \_\_\_\_\_ )  
14. Infecção Secundária: ..... ( ) Sim ( ) Não

### **História Progressiva de Leishmaniose Cutânea**

15.  
cicatriz sugestiva de Leishmaniose cutânea ..... (\_\_\_\_)
16. Nº de cicatrizes ..... (\_\_\_\_)
17. Tempo de duração das cicatrizes (anos) ..... (\_\_\_\_)

### **Lifadenopatia**

18. Lifadenopatia presente ..... ( ) Sim ( ) Não
19. Cadeia(s) Envovida(s): ( ) Cervical ( ) Occipital ( ) Axilar ( ) Inguinal ( )  
Crural ( ) Outra
20.  
amanho do maior linfonodo (mm): ..... (\_\_\_\_ x \_\_\_\_)

### **Tratamento**

21. Medicações em uso atual
- a) Antibióticos ..... ( ) Sim ( ) Não
- b) Anti-inflamatórios ..... ( ) Sim ( ) Não
- c) Corticóides ..... ( ) Sim ( ) Não
- d) Anti-hipertensivos ..... ( ) Sim ( ) Não
- e) Contraceptivos hormonais ..... ( ) Sim ( ) Não
- f) Anti-helmínticos ..... ( ) Sim ( ) Não
22. Tratamento prescrito:
- a) Glucantime IV ..... ( ) 20mg/kg às 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> feira
- b) Duração..... ( ) 7 semanas
23. Medicções Associadas: ( ) Nenhuma ( ) GMCSF ( ) Pentoxifilina  
( ) Outra
24. Outro Tratamento: ( ) Anfotericina ( ) Pentamidina ( ) Aminosidina  
( ) Miltefosina

VISITA 02 (30 DIAS)

Data: \_\_\_\_\_ N° do LTCP (\_\_\_\_\_)

**Avaliação do Tratamento**

1. Efeitos colaterais desde a última visita .....( ) Sim ( ) Não  
Cefaléia ..... ( ) Sim ( ) Não  
Náuseas/vômitos ..... ( ) Sim ( ) Não  
Flebite ..... ( ) Sim ( ) Não  
Artralgia ..... ( ) Sim ( ) Não  
Mialgia ..... ( ) Sim ( ) Não  
Outro(s) \_\_\_\_\_
2. Houve modificação da dose do Glucantime até agora? .....( ) Sim ( ) Não  
a. Se sim, especificar nova dose: \_\_\_\_\_
3. Vinha em uso regular do Glucantime? .....( ) Sim ( ) Não
4. Vem em uso de outra droga (nome e dosagem): \_\_\_\_\_
5. \_\_\_\_\_ Cicatrização da maior lesão da visita 01.....( ) Nenhuma ( ) Parcial ( ) Total
6. Cicatrização das outras lesões da visita 01.....( ) Nenhuma ( ) Parcial ( ) Total

**Exame da Pele**

7. Local da maior lesão (marque apenas UM):  
( )Cabeça ( )Face ( )Pescoço ( )Tronco ( )Braço D ( )Braço E ( )Antebraço D  
( )Antebraço E ( )Coxa D ( )Coxa E ( )Perna D ( )Perna E  
( )Outro: \_\_\_\_\_
8. Tamanho da maior lesão (mm): ..... ( \_\_\_\_\_ x \_\_\_\_\_ )
9. Tipo da Lesão:  
( ) Pápula ( ) Nódulo ( ) Exulceração ( ) Pápula com Exulceração  
( ) Nódulo com Exulceração ( ) Ulcerada ( ) NA
10. Infecção Secundária: .....( ) Sim ( ) Não
11. Novas lesões: .....( ) Sim ( ) Não
12. Se sim, especificar quantidade, local e tipo da nova lesão:  
( ) Cabeça \_\_\_\_\_ ( ) Face \_\_\_\_\_  
( ) Pescoço \_\_\_\_\_ ( ) Tronco \_\_\_\_\_  
( ) Braço D \_\_\_\_\_ ( ) Braço E \_\_\_\_\_  
( ) Antebraço D \_\_\_\_\_ ( ) Antebraço E \_\_\_\_\_  
( ) Coxa D \_\_\_\_\_ ( ) Coxa E \_\_\_\_\_  
( ) Perna D \_\_\_\_\_ ( ) Perna E \_\_\_\_\_  
( ) Outro: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

**Lifadenopatia**

13. Lifadenopatia presente .....( ) Sim ( ) Não
14. Cadeia(s) Envolvida(s):( ) Cervical ( ) Occipital ( ) Axilar ( ) Inguinal ( ) Crural  
( ) Outra
15. Taman  
ho do maior linfonodo (mm): ..... ( \_\_\_\_ x \_\_\_\_ )

VISITA O3 (60 DIAS)

Data: \_\_\_\_\_

Nº do LTCP (\_\_\_\_\_)

**Avaliação do Tratamento**

1. Efeitos colaterais desde a última visita .....( ) Sim ( ) Não  
Cefaléia ..... ( ) Sim ( ) Não  
Náuseas/vômitos ..... ( ) Sim ( ) Não  
Flebite ..... ( ) Sim ( ) Não  
Artralgia ..... ( ) Sim ( ) Não  
Mialgia ..... ( ) Sim ( ) Não  
Outro (s) \_\_\_\_\_
2. Houve modificação da dose do Glucantime até agora? .....( ) Sim ( ) Não  
a. Se sim, especificar nova dose: \_\_\_\_\_
3. Vinha em uso regular do Glucantime? .....( ) Sim ( ) Não
4. Vem em uso de outra droga (nome e dosagem): \_\_\_\_\_
5. Cicatrização da maior lesão da visita 01.....( ) Nenhuma ( ) Parcial ( ) Total
6. Cicatrização das outras lesões da visita 01.....( ) Nenhuma ( ) Parcial ( ) Total

**Exame da Pele**

7. Local da maior lesão (marque apenas UM):  
( )Cabeça ( )Face ( )Pescoço ( )Tronco ( )Braço D ( )Braço E ( )Antebraço D  
( )Antebraço E ( )Coxa D ( )Coxa E ( )Perna D ( )Perna E  
( )Outro: \_\_\_\_\_
8. Tamanho da maior lesão (mm): ..... ( \_\_\_\_\_ x \_\_\_\_\_ )
9. Tipo da Lesão:  
( )Pápula ( )Nódulo ( )Exulceração ( )Pápula com Exulceração  
( )Nódulo com Exulceração ( )Ulcerada ( )NA
10. Infecção Secundária: .....( ) Sim ( ) Não
11. Novas lesões: .....( ) Sim ( ) Não
12. Se sim, especificar quantidade, local e tipo da nova lesão:  
( ) Cabeça \_\_\_\_\_ ( ) Face \_\_\_\_\_  
( ) Pescoço \_\_\_\_\_ ( ) Tronco \_\_\_\_\_  
( ) Braço D \_\_\_\_\_ ( ) Braço E \_\_\_\_\_  
( ) Antebraço D \_\_\_\_\_ ( ) Antebraço E \_\_\_\_\_  
( ) Coxa D \_\_\_\_\_ ( ) Coxa E \_\_\_\_\_  
( ) Perna D \_\_\_\_\_ ( ) Perna E \_\_\_\_\_  
( ) Outro: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

VISITA O4 (90 DIAS)

Data: \_\_\_\_\_

Nº do LTCP (\_\_\_\_\_)

**Avaliação do Tratamento**

1. Efeitos colaterais desde a última visita .....( ) Sim ( ) Não  
( ) Cefaléia ( ) Mialgias ( ) Artralgias ( ) Náuseas/Vômitos ( ) Flebite  
( ) Outro \_\_\_\_\_
2. Houve modificação da dose do Glucantime até agora? .....( ) Sim ( ) Não  
b. Se sim, especificar nova dose: \_\_\_\_\_
3. Vinha em uso regular do Glucantime? ..... ( ) Sim ( ) Não
4. Vem em uso de outra droga (nome e dosagem): \_\_\_\_\_
5. Cicatrização da maior lesão: ..... ( ) Nenhuma ( ) Parcial ( ) Total
6. Cicatrização das outras lesões: ..... ( ) Nenhuma ( ) Parcial ( ) Total

**Exame da Pele**

7. Local da maior lesão ativa (marque apenas UM):  
( ) Cabeça ( ) Face ( ) Pescoço ( ) Tronco ( ) Braço D ( ) Braço E ( ) Antebraço D  
( ) Antebraço E ( ) Coxa D ( ) Coxa E ( ) Perna D ( ) Perna E ( ) Outro: \_\_\_\_\_
8. Tamanho da maior lesão (mm): ..... (      x      )
9. Tipo da Lesão:  
( ) Pápula ( ) Nódulo ( ) Exulceração ( ) Pápula com Exulceração  
( ) Nódulo com Exulceração ( ) Ulcerada ( ) NA
10. Infecção Secundária: .....( ) Sim ( ) Não
11. Novas lesões: .....( ) Sim ( ) Não

12. Se sim, especificar quantidade, local e tipo da nova lesão:

- ( ) Cabeça \_\_\_\_\_ ( ) Face \_\_\_\_\_  
( ) Pescoço \_\_\_\_\_ ( ) Tronco \_\_\_\_\_  
( ) Braço D \_\_\_\_\_ ( ) Braço E \_\_\_\_\_  
( ) Antebraço D \_\_\_\_\_ ( ) Antebraço E \_\_\_\_\_  
( ) Coxa D \_\_\_\_\_ ( ) Coxa E \_\_\_\_\_  
( ) Perna D \_\_\_\_\_ ( ) Perna E \_\_\_\_\_  
( ) Outro: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

**Desfecho do Tratamento**

13. Conclusão Atual do Tratamento: ..... ( ) Cura ( ) Falha ( ) Abandono

14. Indicado novo tratamento para Leishmaniose: ..... ( ) Sim ( ) Não

15. Se "sim", especifique medicação: \_\_\_\_\_

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**Nome do Projeto:** ASPECTOS CLÍNICOS, IMUNOLÓGICOS E TERAPÊUTICOS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM IDOSOS.

**NOME DO PACIENTE:**

---

**Investigador Principal:** Edgar M. Carvalho, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador – Bahia - Brasil.

**Nº do Projeto:**

**Convite e Objetivo:** Você é convidado (a) a participar como voluntário(a) de uma pesquisa que pretende comparar pacientes idosos com pacientes jovens com leishmaniose cutânea (LC) quanto à(s): manifestações clínicas, resposta imune à antígenos de leishmania e à resposta ao tratamento com glucantine. O trabalho é importante, pois existe uma falta de estudos sobre a LC em pacientes acima de 60 anos e pouco é conhecido sobre a eficácia do glucantine nesta população. Dessa forma, desejamos contribuir para o maior conhecimento desse assunto e sua participação é muito importante para esse processo.

**Participação voluntária:** Caso você aceite participar voluntariamente, a duração do estudo será de 90 dias, sendo uma visita inicial e mais três de seguimento. Se não houver cura dentro desse período, você será acompanhado seguindo a rotina do Posto de Saúde de Corte de Pedra. 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.

**Finalidade do estudo:** Este estudo vai comparar como se apresenta a LC em idosos e jovens e como pessoas com idades diferentes respondem ao tratamento com o glucantine. Vamos também estudar como o seu corpo se defende quando atacado pela leishmania. Para isto estudaremos o seu sangue e material da ferida obtida pela retirada de um pequeno pedaço da sua pele.

**Procedimentos:** Caso você concorde em participar do estudo, além de ser examinado pelo médico, será necessário fotografar suas lesões e realizar coleta de sangue (2 colheres de sopa de sangue), biópsia da lesão e teste intradérmico com antígeno de leishmania. Esses procedimentos visam o diagnóstico da leishmaniose e avaliação de possíveis doenças que você possa apresentar. É possível que aconteçam desconfortos secundários a realização dos exames, como dor e vermelhidão no local, mas a ocorrência desses efeitos é rara por termos profissionais capacitados trabalhando na equipe de coleta. Salientamos que todo o material utilizado é descartável e/ou devidamente esterilizado. Na ocorrência de algum efeito adverso ou qualquer outro problema relacionado com a pesquisa você terá direito à assistência gratuita no posto de saúde. Caso o diagnóstico de leishmaniose não seja confirmado, todo o material obtido para pesquisa será destruído.

**Duração do estudo:** Após a assinatura do termo de consentimento e confirmação do diagnóstico sua participação no estudo acabará em 90 dias. Você será examinado para determinar a cura da doença ou necessidade de utilização da continuação do tratamento, que também lhe será fornecido gratuitamente. Isto não faz parte do estudo.

**Confidencialidade:** Embora o questionário a ser utilizado tem como finalidade a coleta de informações demográficas e dados sobre a doença, você tem o direito de não responder a qualquer questão que considere invasão de privacidade. Ao aceitar participar do nosso estudo você nos permite divulgar os resultados do mesmo em trabalhos científicos, que podem ser publicados em revistas ou apresentados em congressos para a comunidade científica. No entanto, garantimos sigilo da sua identidade, assim como de todos os participantes do estudo. Qualquer informação pessoal obtida durante o estudo só será do conhecimento da equipe e, caso requerido, por alguma instituição de controle. A confidencialidade estará de acordo com a Constituição Brasileira e a Resolução 196/96. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica responsável pelo estudo.

**Análises de riscos e benefícios:** O tratamento que você receberá é semelhante ao que todos os pacientes receberão participando ou não do estudo. O procedimento adicional para os participantes do estudo é a retirada de sangue para o acompanhamento do seu

tratamento e para a avaliação imunológica. Como a equipe tem vasta experiência na coleta deste material, acreditamos que não haverá risco importante.

**Retorno de benefícios para o sujeito e para a sociedade:** Muito pouco é conhecido sobre a leishmania em pacientes acima dos 60 anos. Embora você vá receber o mesmo tratamento que outros pacientes atendidos no Posto de Saúde, o fato de você realizar exames e ser acompanhado, pode contribuir em detectarmos e tratarmos efeitos adversos ao tratamento. Para a sociedade o trabalho será de grande importância, pois com o mesmo conheceremos mais a respeito da leishmaniose em idosos, o que permitirá uma melhor orientação sobre o tratamento desta doença nesta população.

**Custos:** Você não terá custos com o tratamento com o Glucantime 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 o Dr. Edgar M. Carvalho ou Dr. Luiz Henrique Guimarães. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Bahia, cujo endereço encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone (71) 3283-5564.

**Consentimento:** Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Eu, \_\_\_\_\_, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável para esclarecer todas as minhas dúvidas acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

---

Assinatura do voluntário ou de seu representante legal

---

Assinatura de uma testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste voluntário (ou de seu representante legal) para a participação neste estudo.

---

Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE