

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Núcleo de Medicina Tropical
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

MARCIA HUEB

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO LEISHVACIN® NO TRATAMENTO
DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

**TESE APRESENTADA AO NÚCLEO
DE MEDICINA TROPICAL DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA PARA
A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTORA EM MEDICINA TROPICAL**

ORIENTADOR
PROF. DR. GUSTAVO ADOLFO SIERRA ROMERO

Brasília , 2007

H887 Hueb, Marcia.

Avaliação da eficácia do Leishvacin no tratamento de leishmaniose cutânea / Marcia Hueb – 2007.

184 f. : il.; 30 cm.

Orientação: Gustavo Adolfo Sierra Romero.

Tese (doutorado) – Universidade de Brasília, Núcleo de Medicina Tropical, 2007.

Inclui bibliografia.

1. Leishmaniose cutânea - Tratamento. 2. Leishvacin. 3. Ensaio clínico. I. Romero, Gustavo Adolfo Sierra. II. Universidade de Brasília. Núcleo de Medicina Tropical. III. Título.

CDU 616.993.161

À Laura e Júlia, motivo de tudo desde a chegada.

Ao Tadeu, por sempre me aceitar, por sempre me acolher, por sempre me
cuidar.

Aos meus pais, Noely e Nagib, pela confiança e admiração com que sempre me
olharam, muito antes de eu mesma saber por que.

AGRADECIMENTOS

Ao Gustavo que mesmo antes de termos um projeto, já me indicava vôos mais altos. Depois, pela inteligência na condução dos trabalhos, pelo interesse em sempre escutar, pelo acolhimento em condições de igualdade e amizade. Obrigada pra sempre.

À Ana Nilce, Jackson Costa e Maria Regina, pela confiança da escolha; Jackson, pela elaboração inicial de tudo; Ana Nilce, pelo auxílio incansável.

Ao Cor Jesus, de certa forma mentor de todos nós, não importa qual seja o nosso caminho. Pela inteligência estimuladora, pelo auxílio sempre presente na hora necessária. Pela amizade eterna.

À Professora Vanize Macedo, mentora inicial em minha caminhada tropicalista, incentivadora e exemplo de sempre.

Aos amigos-colegas do curso de pós-graduação, todos, porque em algum momento estivemos juntos nessa caminhada. Ao Juan, "vizinho" e portador de uma gentileza inata; à Inês e Carlos pela presença gentil e compartilhamento de idéias. E, especialmente à Maria Paula e Marcus que me *adotaram* (em sentido contrário ao curso natural), me cercaram de cuidados e me incentivaram com sua inteligência e juventude.

Ao Professor Cleudsom, cordato e incentivador desde antes.

Ao Professor Barberino, pela dedicação inspiradora desde a especialização.

Ao Professor Aluízio Prata que sempre demonstrou interesse em nosso desenvolvimento local.

Aos residentes da *nossa* infectologia do HUJM, pela presença que em si é motivadora e por estarem ali sempre que precisei. Especialmente Andréa que me acompanha há muito e tem sido meu outro braço; Luciano por *segurar* o ambulatório quando precisei estar ausente; Maíra pela presença constante e amizade; Giovana, pela presença afetiva, responsável e constante, mesmo antes de se juntar a nós. Também à Lidiane, pelo auxílio constante. A todos que estão e virão. Muito obrigada.

À Maria Celina e James “Xexéu”, pela participação em todas as etapas, pela amizade com que me auxiliaram, pela atenção carinhosa aos pacientes.

A todos os outros que me auxiliaram; Marly e D. Edna, pela dedicação aos pacientes; à Ana Lúcia, por sua colaboração para que outros pudessem se dedicar ao meu trabalho.

Ao amigo Francisco Souto, pela presença na hora necessária e inspiração pelo bom caminho. À Yvelise pelo respeito e auxílio à minha caminhada.

À Terezinha Mesquita pelo que realizamos e pelo que iremos ainda realizar.

À Tomoko, por ter permitido o começo na hora em que eu precisava. Obrigada sempre.

À Aldina Barral, pela confiança imediata e pelo bem receber em *sua casa*.

À Elisa Cupollilo, pela amizade e seriedade com que tem nos auxiliado.

Aos amigos – tantos em presença, poucos em números – pelo incentivo, e principalmente, por *acolher* os meus e facilitar o meu *recolher*. Um beijo no coração de cada um.

O infinito ciclo de idéias e da ação,
Infinita experiência, infinita invenção,
Traz o conhecimento do vôo, mas não o do repouso;
O conhecimento da fala, mas não o do silêncio;
O conhecimento das palavras e a ignorância do Verbo.
Todo o nosso conhecimento nos aproxima da ignorância,
Toda a nossa ignorância nos avizinha da morte,
Mas a iminência da morte não nos acerca de DEUS.
Onde a vida que perdemos quando vivos?
Onde a sabedoria que perdemos no saber?
Onde o conhecimento que perdemos na informação?
Os ciclos do Céu em vinte séculos
Afastaram-nos de DEUS e do Pó nos cercaram.

T. S. Eliot

The Rock (1934)

Tradução de Ivan Junqueira

SUMÁRIO	<i>Página</i>
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. CONCEITOS E ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)	14
1.2. TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA): REVISÃO SOBRE O TEMA	22
1.3. JUSTIFICATIVA PARA AVALIAÇÃO DE ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS E DO USO DE IMUNOTERÁPICOS NO TRATAMENTO DA LTA. BREVE DISCUSSÃO DA IMUNOPATOGENESE DA DOENÇA.	29
1.4. REVISÃO HISTÓRICA DO USO DO LEISHVACIN® NA IMUNOPROFILAXIA E IMUNOTERAPIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)	35
1.4.1. Imunoprofilaxia com o Leishvacin®: revisão dos trabalhos publicados	37
1.4.2. Imunoterapia com o Leishvacin®: revisão dos trabalhos publicados	40
1.5. JUSTIFICATIVA PARA AVALIAÇÃO DO LEISHVACIN® COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)	42
2. OBJETIVOS	45
3. PACIENTES E MÉTODOS	46
3.1. TIPO DE ESTUDO	46
3.2. LOCAL DE ESTUDO	47
3.2.1 Condições para execução do projeto	47
3.3. PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO	48
3.4. CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA	49
3.5. DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO	50

SUMÁRIO

Página

3.5.1. Definição de caso	50
3.5.2. Critérios de inclusão, não-inclusão, exclusão após randomização, retirada do estudo e perda.	53
3.5.3. Atendimento inicial	55
3.5.4. Procedimentos diagnósticos específicos	56
3.5.4.1. <i>Intradermorreação de Montenegro (IRM)</i>	56
3.5.4.2. <i>Raspado para exames parasitológicos</i>	57
3.5.4.3. <i>Aspirado de borda externa de lesão</i>	57
3.5.4.4. <i>Biópsia</i>	59
3.5.5. Atendimento clínico após confirmação parasitológica para abordagem sobre inclusão no estudo	61
3.5.6. Randomização	62
3.5.7. Intervenção Terapêutica	63
3.5.8. Avaliação clínica e por exames complementares no período de tratamento	65
3.5.8.1. <i>Avaliação Clínica</i>	65
3.5.8.2. <i>Avaliação laboratorial</i>	65
3.5.8.3. <i>Avaliação por Eletrocardiograma (ECG)</i>	66
3.5.9. Avaliação da resposta terapêutica	67
3.5.9.1. <i>Seguimento clínico</i>	67
3.5.9.2. <i>Avaliação da incidência de eventos adversos</i>	67
3.5.9.3. <i>Parâmetros de resposta terapêutica</i>	68
3.5.9.4. <i>Desfechos clínicos primários</i>	70

SUMÁRIO	<i>Página</i>
3.6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	71
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
4. RESULTADOS	76
4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AMOSTRA	76
4.1.1. Características sócio-demográficas	79
4. 1. 2. Características clínico-laboratoriais	82
4. 2. ANÁLISES DOS DESFECHOS PRINCIPAIS CURA E FALHA	86
4. 2. 1. Intenção de tratar	86
4. 2. 2. Análise per protocolo	86
4. 2. 3. Descrição das falhas	89
4. 2. 4. Análise de tempo até a falha pelo método de Kaplan-Meier	90
4. 2. 5. Descrição da cura	92
4. 3. ANÁLISE EXPLORATÓRIA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS E DESFECHOS CURA E FALHA.	93
4. 4. RESULTADO DA ANALISE MULTIVARIADA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS E DESFECHOS CURA E FALHA.	95
4. 5. EVENTOS ADVERSOS	96
4.5.1. Eventos adversos medidos por observação clínica	96
4.5.1.1 <i>Grupo L ou Leishvacin</i>	96
4.5.1.2 <i>Grupo G ou Glucantime</i>	98
4.5.1.3 <i>Análise comparativa dos eventos adversos nos grupos de estudo.</i>	100

SUMÁRIO	<i>Página</i>
4.5.2. Avaliação evolutiva das análises laboratoriais.	102
5. DISCUSSÃO	105
5.1. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	105
5.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE O PLANEJAMENTO DO ESTUDO: AMOSTRAGEM, CONTROLE E MASCARAMENTO	107
5.3 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA	112
5.4 ANÁLISE DOS DESFECHOS PRINCIPAIS – CURA E FALHA	120
5.5. ANÁLISE DOS EVENTOS ADVERSOS	125
6. CONCLUSÕES	131
7. RESUMO	132
8. SUMMARY	134
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
10. ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS E TABELAS NA SEQUENCIA DO TEXTO

Página

Figura 1.	Leishmaniose tegumentar no Brasil: classificação clínica e respectivos agentes etiológicos (BRASIL, 2007)	20
Figura 2.	Fluxograma para atendimento e definição de caso de LC	52
Tabela 1.	Dados da leishmaniose tegumentar em Mato Grosso e no ambulatório de leishmanioses do Hospital Universitário Júlio Müller, no período 2004 a 2006.	78
Figura 3.	Distribuição dos pacientes do ensaio clínico "Eficácia do Leishvacin® no tratamento da leishmaniose cutânea"	79
Tabela 2.	Comparabilidade das características sócio-demográficas de 66 pacientes incluídos no estudo de eficácia de Leishvacin® no tratamento da leishmaniose cutânea. Mato Grosso 2004-2007.	81
Tabela 3.	Características clínico-laboratoriais dos 66 pacientes incluídos no estudo de eficácia de Leishvacin® na leishmaniose cutânea. Mato Grosso, 2004-2006.	84
Tabela 4.	Detalhamento dos resultados dos exames com pesquisa de parasitas, nos 66 pacientes incluídos no estudo de eficácia de Leishvacin® na leishmaniose cutânea. Mato Grosso, 2004-2006.	85
Tabela 5.	Resultado da análise da eficácia do Leishvacin® comparado ao Glucantime® no tratamento da leishmaniose cutânea. Mato Grosso, 2004-2006	88
Tabela 6.	Detalhamento das falhas terapêuticas ocorridas no estudo da eficácia do Leishvacin® considerando-se os 3 meses de seguimento após o uso do medicamento. Mato Grosso, 2004-2006.	89

LISTA DE FIGURAS E TABELAS NA SEQUENCIA DO TEXTO

Página

Figura 4.	Probabilidade estimada de sobrevivência sem apresentar falha no estudo de avaliação de eficácia do Leishvacin®, por grupo de tratamento e considerando-se 15 semanas de seguimento. Mato Grosso, 2004-2006.	91
Tabela 7.	Detalhamento das curas ocorridas no estudo da eficácia do Leishvacin® considerando-se os 3 meses de seguimento após o uso do medicamento. Mato Grosso, 2004-2006.	92
Tabela 8.	Análise exploratória da associação de características clínico-laboratoriais com a cura clínica, em pacientes do estudo de avaliação da eficácia do Leishvacin® na leishmaniose cutânea. Mato Grosso, 2004-2006.	94
Tabela 9.	Resultado da análise multivariada da associação entre características clínicas e falha terapêutica com Leishvacin em pacientes do estudo de avaliação da eficácia do Leishvacin® na leishmaniose cutânea. Mato Grosso, 2004-2006.	95
Tabela 10.	Eventos adversos presentes nas consultas de D10, D20, D50, para os pacientes do estudo da eficácia do Leishvacin® na leishmaniose cutânea, grupo Leishvacin® (N=34). Mato Grosso, 2004-2006.	97
Tabela 11.	Eventos adversos presentes nas consultas de D10, D20, D50, para os pacientes do estudo da eficácia do Leishvacin® na leishmaniose cutânea, grupo Glucantime® (N=32). Mato Grosso, 2004-2006.	99
Tabela 12.	Análise comparativa da incidência global de eventos adversos referidos ou questionados, para os pacientes do estudo da eficácia do Leishvacin® na leishmaniose cutânea (N=66). Mato Grosso, 2004-2006.	101

LISTA DE FIGURAS E TABELAS NA SEQUENCIA DO TEXTO

Página

- | | | |
|-------------------|--|-----|
| Tabela 13. | Avaliação evolutiva das análises laboratoriais, para os pacientes do estudo da eficácia do Leishvacin® na leishmaniose cutânea, grupo Leishvacin®. Mato Grosso, 2004-2006. | 103 |
| Tabela 14. | Avaliação evolutiva das análises laboratoriais, para os pacientes do estudo da eficácia do Leishvacin® na leishmaniose cutânea, grupo Glucantime®. Mato Grosso, 2004-2006. | 104 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONCEITOS E ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

As leishmanioses são doenças parasitárias que têm como agentes etiológicos protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903, podendo manifestar-se clinicamente por lesões de pele ou mucosas no caso da leishmaniose tegumentar (LT) ou por lesões viscerais na leishmaniose visceral (LV), também chamada calazar. Compreendem um espectro clínico variável, a depender da espécie de *Leishmania* envolvida, bem como das interações do parasito com o sistema imune do organismo infectado.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a leishmaniose como uma das seis principais doenças tropicais no mundo, com uma incidência anual da ordem de 1,5 milhão de casos de leishmaniose cutânea e 500 mil casos de LV. A prevalência global de casos é estimada em 12 milhões, sendo a população de risco para adquirir a doença da ordem de 350 milhões de pessoas, distribuída em 88 países. Incide principalmente em populações de países subdesenvolvidos, constituindo o seu controle um desafio às autoridades médico-sanitárias (WHO, 1990; DESJEUX, 1992, 1996, 2004).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma antropozoonose que atinge o homem quando este se expõe à cadeia natural de transmissão da doença e acidentalmente entra em contato com as diversas espécies de leishmânias patogênicas (LAINSON & SHAW, 1992; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994;

BRASIL, 2007). Definem-se três diferentes padrões de transmissão da doença no Brasil. O primeiro, chamado padrão silvestre, em que a transmissão se dá exclusivamente em área de vegetação primária onde ocorre naturalmente a enzootia, havendo transmissão ao homem quando este se expõe a esse ambiente; pode ocorrer de forma isolada ou em epidemias. O padrão chamado de ocupacional e de lazer tem transmissão associada à presença do homem no ambiente silvestre em modificação por ações como derrubada das matas para a construção de estradas, assentamentos de colonizadores em regiões pioneiras, hidrelétricas, ou para realização de manobras militares e atividades de ecoturismo, por exemplo, podendo ocorrer de forma epidêmica ou endêmica. O padrão rural e periurbano é registrado em regiões de colonização antiga ou em áreas de ocupação de encostas e aglomerados humanos em torno de centros urbanos, estando associado à presença de matas secundárias ou residuais (BRASIL, 2006, 2007).

Os padrões relacionados às áreas de floresta ou matas primárias são considerados de comportamento padrão para a LTA (SHAW & LAINSON, 1987). O outro padrão ocorreria em condições ambientais modificadas em que os insetos vetores estariam adaptados a um novo habitat peridoméstico ou até intradomiciliar, e os reservatórios poderiam ser animais de comportamento doméstico como os cães, os cavalos e outras espécies de eqüinos (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; BRASIL, 2007). Estudos em áreas endêmicas de LTA por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, especialmente nos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, encontraram relação da infecção no homem com infecção em cães e mais raramente com outros animais domésticos e sinantrópicos como

certos roedores (FALQUETO *et al.*, 1986, 2003; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994), mas algumas tentativas de redução de incidência de LTA no homem por redução de prevalência de infecção nos cães não resultaram em controle da doença (SESSA, FALQUETO & VAREJÃO, 1994). Há uma diversidade no que se convencionou chamar de áreas periurbanas, incluindo-se nesse conceito desde áreas vizinhas de matas nativas ou secundárias até áreas nitidamente modificadas pela ação do homem na periferia de cidades como Rio de Janeiro (KAWA & SABROZA, 2002). Em uma revisão recente observou-se que em inquéritos anteriormente realizados, cães infectados tinham atividades de caça noturna relatadas por seus donos, com deslocamento para áreas vizinhas de mata, o que poderia sugerir que esses cães poderiam adquirir a infecção em ambiente silvestre e trazer para ambiente peridoméstico (SANTOS *et al.*, 2005). Assim, apesar do papel definido como reservatório na LV por *Leishmania infantum/Leishmania chagasi*, no estado atual do conhecimento, o cão pode ser tão somente reconhecido como hospedeiro acidental na doença tegumentar por *L. (V.) braziliensis* (ASHFORD, 1996). As medidas de controle, baseadas no combate ao vetor, eliminação de reservatórios infectados e modificação do meio ambiente, seriam aplicáveis somente nas situações de transmissão em torno do domicílio, condição associada a essa pequena parcela de casos de LT no Brasil; de fato, o controle da doença encontra-se limitado devido à complexidade da dinâmica de transmissão, restringindo-se à detecção e ao tratamento precoce dos casos humanos, (MARSDEN, 1984; MARSDEN, 1985b; BRASIL, 2007).

No período de 1980 a 2005 (dados preliminares de 2005), o Brasil apresentou um acumulado de 610.256 casos notificados de LT (BRASIL, 2005), variando de 3.000 casos em 1980 a 37.710 em 2001. A tendência ao aumento do número de casos ocorre a partir de 1985 quando da implantação das ações de vigilância e controle. O Ministério da Saúde do Brasil utiliza atualmente o coeficiente de detecção como estatística para consolidação dos dados de LT, considerando que o longo período possível de incubação ou a demora para o diagnóstico da doença podem dissociar a notificação dos casos da incidência real. De 1985 a 2005, observam-se média anual de 28.568 casos e coeficiente de detecção médio de 18,5 casos/100 mil habitantes.

O estado de Mato Grosso (MT), local do estudo ora apresentado, contribuiu com um total de 69.774 (11,4%) de casos da doença no mesmo período; de 1985 a 2005, a variação do número anual de casos foi de 1.157 em 1985 a 5.504 em 1999 e o coeficiente de detecção (casos/100 mil habitantes) variou entre 97,91 em 1996 e 206,05 em 1997 (BRASIL, 2006; BRASIL, 2007). Em 2006, dados preliminares, o total de casos de LT em MT foi 2751, com coeficiente de detecção médio de 189,19 casos/100 mil habitantes, isto é, considerando-se o total de casos pela população do estado naquele ano. Observa-se que este coeficiente é aproximadamente dez vezes maior que o coeficiente médio brasileiro acima referido. O coeficiente de detecção máximo foi de 1964,94 casos/100 mil habitantes, registrado no município de Colniza, localizado ao norte do estado¹ (ANEXO 1).

1 – Secretaria Estadual de Saúde de MT. Coordenação de Vigilância Epidemiológica [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por mahueb@terra.com.br.

Hoje, considera-se para as ações de vigilância e controle, entre outros, o indicador de densidade de casos de LT (número de casos por Km²). No período de 2001 a 2003, identifica-se no Brasil um total de 24 circuitos de produção da doença que respondem por 75% dos casos registrados em 2004. Neste ano, MT esteve presente em dois dos quatro circuitos com maior representação de casos, com taxas de detecção de 293,10 e 217,70 casos/Km², nos circuitos PA/MT E RO/AM/MT, respectivamente (BRASIL, 2007).

No Brasil, são referidas três espécies principais de *Leishmania* associadas aos casos de LT, duas do subgênero *Viannia*, a *L. (V.) braziliensis* e a *Leishmania (Viannia) guyanensis*, e uma do subgênero *Leishmania*, a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Outras espécies já identificadas como associadas a casos esporádicos de leishmaniose cutânea (LC), sobretudo na região da Amazônia, são *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) lindenbergi* (LAINSON & SHAW, 1987; LAINSON & SHAW, 1992; LAINSON et al., 1994; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; SILVEIRA et al., 2002; BRASIL, 2007).

Assim como na maior parte do Brasil, em MT a espécie predominante é a *L. (V.) braziliensis*; em trabalho recente, de um total de 68 isolados, a *L. (L.) amazonensis* foi isolada de 4 casos, sendo a *L. (V.) braziliensis* atribuída aos outros 64 casos (ANDRADE et al., 2005; CARVALHO et al., 2006). Os pacientes eram procedentes de diferentes áreas, mas principalmente de municípios da região norte do estado.

Na LT, há diversidade nas formas de apresentação clínica que podem variar de lesões cutâneas isoladas, de evolução recente e de fácil abordagem

terapêutica, a lesões de maior complexidade. Por exemplo, com envolvimento tardio de mucosas (*espúndia* ou leishmaniose mucosa - LM) ou envolvimento de áreas múltiplas e extensas da pele, como na leishmaniose disseminada e na leishmaniose cutânea difusa (LCD), esta última situada num pólo anérgico da doença (MARSDEN, 1984; MARSDEN et al., 1986; COSTA et al., 1986; COSTA et al., 1992; COSTA et al., 1998; COSTA et al., 1999; BARRAL et al., 1991; CARVALHO et al., 1994; HUEB, 1997b; HUEB, 1997c; CARVALHO et al., 2002).

Uma classificação clínica da doença é mostrada na **figura 1** (MARZOCHI, 1992; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; MARZOCHI, SCHUBACH & MARZOCHI, 1999; BRASIL, 2006; BRASIL, 2007).

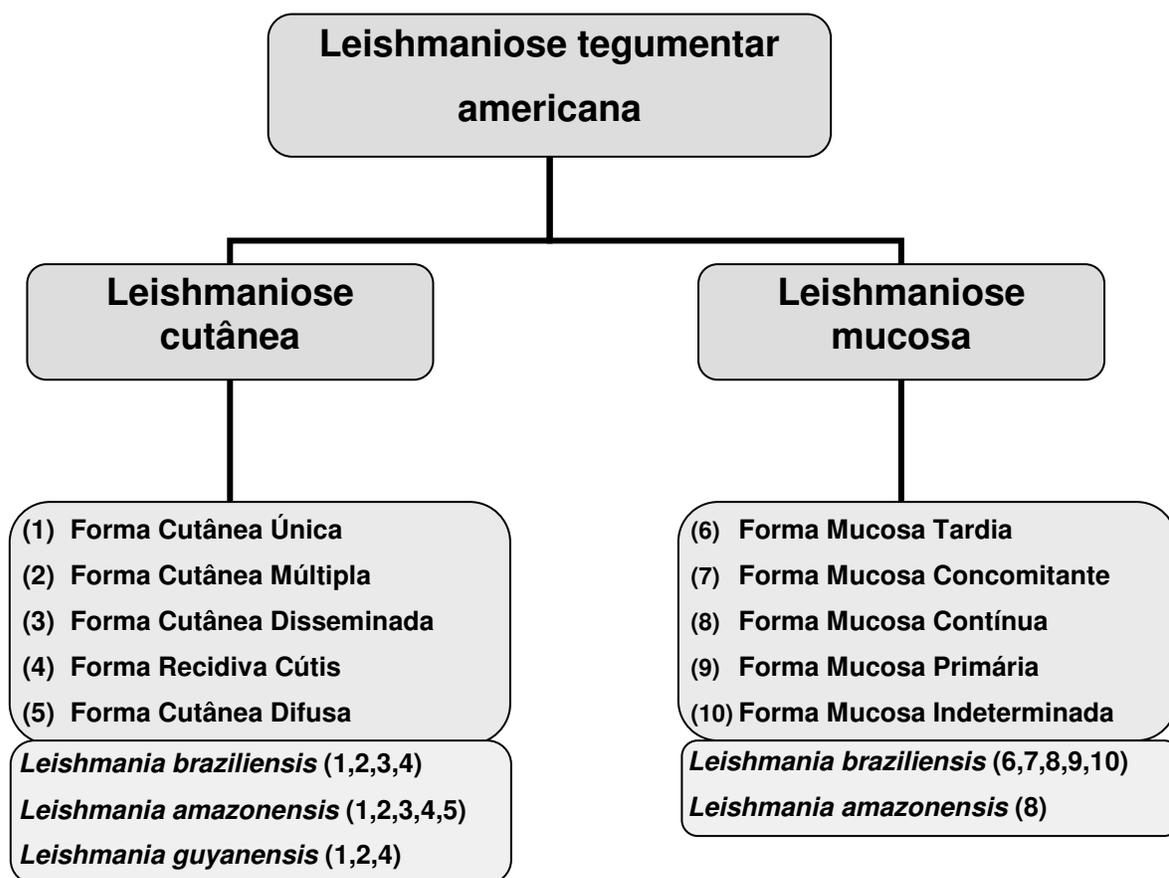


Figura 1. Leishmaniose tegumentar no Brasil: classificação clínica e respectivos agentes etiológicos (BRASIL, 2007).

Nota-se que as formas clínicas estão relacionadas à espécie de *Leishmania*. A *L. (V.) braziliensis* é responsável pela quase totalidade dos casos de LM (MARSDEN, 1986; GRIMALDI, TESH & MCMAHON-PRATT, 1989; GRIMALDI & TESH, 1993; MARSDEN, 1994a; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994), exceto em situações raramente relatadas, como casos isolados de formas mucosas por *L. (V.) guyanensis* (SANTRICH *et al.*, 1990), *L. (L.) amazonensis* (BARRAL *et al.*, 1991) e *Leishmania (Viannia) panamensis* (OSÓRIO, CASTILLO & OCHOA, 1998).

Esse potencial para o desenvolvimento de formas mucosas tardias, de caráter crônico, dependente muitas vezes de intervenções medicamentosas múltiplas, indica uma maior atenção na terapêutica direcionada a essa espécie, de fato, mais prevalente e distribuída em todas as áreas de ocorrência de transmissão da LT no Brasil. As condições associadas ao desenvolvimento de formas mucosas nos pacientes portadores de LC por essa espécie de parasito não são de todo esclarecidas. Fatores como tratamento não efetivo ou até ausência de tratamento, o que geralmente se relaciona com curso clínico prolongado das lesões cutâneas até a cura, parecem estar associados à maior probabilidade futura de desenvolvimento das lesões mucosas, assim como a presença de lesões múltiplas, extensas e de longa duração (LLANOS-CUENTAS et al., 1984; MARSDEN et al., 1984; MARSDEN et al., 1986; JONES *et al.*, 1987). Outros fatores como localização das lesões, co-existência de condições mórbidas debilitantes como a subnutrição, e ainda fatores como sexo masculino e idade adulta poderiam ter algum papel na patogênese desta condição (SARAVIA et al., 1985; NETTO et al., 1990; MARSDEN, 1994; MACHADO-COELHO et al., 2005).

A freqüência elevada de casos de LT, sem perspectiva real de controle e de prevenção baseadas em medidas exeqüíveis e eficazes, reforça a necessidade de busca de alternativas para seu tratamento, hoje realizado com esquemas em que contrastam a boa eficácia com a difícil operacionalização e elevada freqüência de efeitos adversos.

1.2 TRATAMENTO DA LEISHMANOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA): REVISÃO SOBRE O TEMA

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) são as drogas de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses; no Brasil, o Ministério da Saúde tem um programa de distribuição gratuita do medicamento com repasse aos Estados que o disponibilizam aos serviços de saúde responsáveis pela assistência aos doentes.

O uso do antimônio (Sb) como medida terapêutica tem sido referido desde a época das civilizações egípcias quando era utilizado no tratamento de infecções oculares. Por séculos, o tártaro emético, um antimonial trivalente produzido de forma artesanal, foi utilizado no tratamento de diferentes condições clínicas principalmente doenças pulmonares, até que no início do século passado observou-se sua ação terapêutica na doença do sono, hoje tripanossomíase africana. Em 1912, Gaspar Vianna, no Brasil, descreve a ação terapêutica do tártaro emético num paciente com LM, sendo essa ação confirmada em pacientes com LV tratados na Itália e na Índia. Porém, sua eficácia terapêutica viu-se limitada por seus efeitos tóxicos, graves e freqüentes (MARSDEN, 1985a; BERMAN, 1988; GOODWIN, 1995).

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) foram introduzidos em 1920 por Bramachari, com a utilização da Urea Stibamine, que superava os trivalentes em eficácia e apresentava menor toxicidade (MARSDEN, 1985a). Outros antimoniais mais estáveis foram desenvolvidos, sob a forma pentavalente; em 1937, a Wellcome Foundation, sediada na Inglaterra, iniciou os estudos pré-

clínicos do estibugluconato de sódio (GOODWIN, 1995), podendo-se afirmar que os antimônios pentavalentes, ainda hoje, a despeito de todas suas limitações, representam o maior avanço observado no arsenal terapêutico das leishmanioses (MARSDEN, 1985a; BERMAN, 1988; BERMAN, 1997).

Atualmente, os antimoniais pentavalentes encontram-se comercialmente disponíveis sob duas formas de açúcares conjugados, que apresentam similaridade estrutural e pertencem ao mesmo grupo farmacológico (MARSDEN, 1985a; BERMAN, 1988 e 1996). São eles:

1) **Estibogluconato de sódio**, que corresponde ao Sb^{+5} conjugado ao ácido glicônico, comercialmente denominado Pentostam[®], com apresentação de frascos de 100 ml (100mg Sb^{+5} /ml), manufaturado atualmente por *The Wellcome Foundation Ltd-GlaxoSmithKline UK* e amplamente utilizado em países de colonização inglesa, Reino Unido e Estados Unidos da América. Também laboratórios na China e na Índia manufaturam seu próprio estibogluconato, visando reduzir os custos do tratamento.

2) **Antimoniato-N-metilglucamina**, que corresponde ao Sb^{+5} conjugado a metil-glucamina, é comercializado sob a denominação de Glucantime[®] sob a forma de ampolas contendo 5 ml (81mg Sb^{+5} /ml), sendo amplamente utilizado nos países de língua não-inglesa. O laboratório *Rhone Poulenc* era o responsável pela produção de Glucantime[®] na França, sendo fornecido para o Brasil pelo laboratório *Aventis*. Informações disponíveis na página eletrônica do laboratório *Sanofi-Aventis* anunciam a decisão de concentrar a produção do Glucantime[®] em sua fábrica situada no Estado de São Paulo, já a partir de 2007, passando o Brasil a ser responsável, tanto pelo

abastecimento interno do medicamento, como pelo fornecimento para os outros países em que é utilizado (<http://www.sanofi-aventis.com.br/live/br/pt/layout.jsp?cnt=336896D6-0362-4FB1-BA23-0CCFC67257F7>).

Ambas as apresentações dos antimoniais pentavalentes teoricamente equivalem-se quanto ao mecanismo de ação, farmacocinética e farmacodinâmica, esperando-se não haver diferença em termos de eficácia e toxicidade, (MARSDEN, 1985a; BERMAN, 1988; BERMAN, 1997). Entretanto, estudos brasileiros recentemente realizados e publicados, demonstraram diferença significativa de toxicidade entre eles. Estudos comparando antimoniato de meglumina produzidos por diferentes laboratórios encontraram diferença quanto à quantidade de metais em geral detectados nos produtos, com maior presença de arsênio e chumbo no composto que esteve associado a maior frequência de eventos adversos (SILVA Jr, 2001; ROMERO et al., 2003). Em outros relatos, estudos comparando estibogluconato de sódio (composto genérico, produzido na China) e antimoniato de meglumina (Glucantime®) mostraram diferenças significativas na frequência de eventos adversos, maior para o primeiro e provavelmente relacionadas à matéria prima e à metodologia utilizada na manufatura e preservação destes compostos (HUEB et al., 1997a; HUEB et al., 1998a; HUEB et al., 1998b; SALDANHA et al., 2000; DEPS et al., 2000).

De utilização exclusivamente parenteral, após a absorção, os antimoniais pentavalentes atingem uma concentração plasmática maior do que os trivalentes, sendo que a maior parte da dose utilizada é rapidamente excretada

via renal, nas primeiras vinte e quatro horas (REES et al., 1980). A eliminação da droga ocorre em duas fases distintas:

1. Uma fase de eliminação rápida, com a meia-vida aproximada de duas horas, havendo redução dos níveis sanguíneos para 1% da dose inicial após um período de 6h, independente da via de administração utilizada, se EV ou IM (MARSDEN, 1985a). Entretanto, há evidências de que a administração pela via intramuscular manteria uma concentração sérica menor por tempo mais prolongado (REES et al., 1980).

2. Uma fase de eliminação lenta com meia-vida de aproximadamente 33 a 72 horas, na qual parece ocorrer uma conversão para antimonial trivalente, que seria responsável pelo aumento cumulativo das concentrações basais da droga e pelo aparecimento dos efeitos adversos e toxicidade dos antimoniais (CHULAY et al., 1988). A maior parte da droga retida encontra-se depositada em fígado e baço (MARSDEN, 1985a; OSTER et al., 1985; OUELLETE et al., 1993).

A atividade dos antimoniais apresenta variação conforme espécie e cepa da *Leishmania* envolvida, havendo relatos de resistência primária à droga (OUELLETE et al., 1993; ROMERO, 2000; ROMERO et al., 2001; CROFT, YARDLEY & KENDRICK, 2002; YARDLEY et al., 2006). Sua eficácia pode ainda variar de lote para lote do medicamento, que podem conter diferentes concentrações de Sb^{+5} , demonstráveis por técnicas químico-analíticas. O modo e o tempo de armazenamento da medicação podem alterar as concentrações de Sb^{+5} nas ampolas (MARSDEN, 1985a; ROMERO et al., 1996).

Estima-se atualmente, que o custo específico total do tratamento da LT com o antimoniato de meglumina utilizado no Brasil, o Glucantime[®], seja em média de 250 reais por paciente, dependendo da resposta terapêutica apresentada. Os custos adicionais são imprecisos, envolvendo profissionais, exames laboratoriais, transporte, seringas, entre outros.

A toxicidade medida pelo aparecimento de efeitos adversos e alterações nos exames complementares parece ser dose-dependente. Há poucos relatos na literatura sobre detecção precoce dos mesmos, fase em que a dose acumulada seja talvez de pouca significância (MARSDEN, 1985a; THAKUR, 1986; CASTRO, SAMPAIO & MARSDEN, 1990; RIBEIRO et al., 1999). O aumento cumulativo das concentrações basais e a transformação de pentavalente em trivalente parecem ser os fatores determinantes destes efeitos relacionados ao uso da droga. Ocorrem, geralmente, da metade para o final do tratamento, entre a 2^a e a 3^a semana, sendo de intensidade e importância clínica variáveis, havendo necessidade de interrupção do esquema terapêutico somente em poucos casos (LAWN et al., 2006). A frequência com que estes efeitos adversos ocorrem é variável. Mialgia e artralgia estão entre os mais comuns e em pacientes tratados com esquemas de 20 mg/Sb⁺⁵/kg/dia têm sido descritos em até 50 a 80% dos casos (BERMAN, 1988; BERMAN, 1997; DEPS et al., 2000; SALDANHA et al., 2000).

Alterações eletrocardiográficas tais como achatamento ou inversão de onda T ou prolongamento do intervalo QT, são descritas como repercussões cardíacas relacionadas ao uso dos antimoniais pentavalentes, estando diretamente relacionadas à duração do esquema terapêutico e à dose diária de

Sb⁺⁵ utilizada (BRYCESON et al., 1985; CHULAY et al., 1985; CHULAY et al., 1988; SALDANHA et al., 2000). Alguns poucos relatos descreveram alterações precoces, com doses baixas, talvez pela existência de alterações cardiológicas não detectadas nos exames pré-tratamento ou por mecanismos outros não conhecidos de cardiotoxicidade dos antimoniais (HUEB et al., 1997^a; HUEB et al., 1998b; RIBEIRO et al., 1999; RODRIGUES et al., 2007). A ocorrência de morte súbita relacionada ao uso dos antimoniais, rara, mas preocupante, parece também depender do uso prolongado e eventualmente de doses elevadas do Sb⁺⁵ (CHULAY et al., 1985; OLIVEIRA et al., 2005).

Outros efeitos adversos descritos com menor frequência são alterações da função renal e elevação de enzimas hepáticas, com aumento dos níveis séricos de uréia e creatinina, proteinúria, alteração da capacidade de concentração urinária, elevação dos níveis séricos de transaminases e fosfatase alcalina, que podem funcionar como indicadores de toxicidade da droga (VEIGA et al., 1983; MARSDEN, 1985a; NAVIN et al., 1992). Existem relatos de pancreatite aguda atribuída ao uso dos antimoniais pentavalentes (TORRÚS et al., 1996; GASSER et al., 1994; LAMBERTUCCI, FRANÇA & QUEIROZ, 2004), entretanto é um efeito tóxico pouco observado, pois a freqüente alteração das enzimas pancreáticas não se associa a manifestação clínica na grande maioria dos casos (BERMAN, 1997; HUEB et al., 1998c; SALDANHA, 2000; DEPS et al., 2000;). Náuseas, vômitos, cefaléia, fraqueza, anorexia, palpitações, dores epigástricas, neuropatias periféricas, lesões herpéticas e febre, entre outros, também são efeitos adversos relatados com a utilização

dos antimoniais pentavalentes (MARSDEN, 1985a; NAVIN et al., 1992; SEATON et al., 1999; DEPS et al., 2000).

Estudos de avaliação de eficácia dos antimoniais no tratamento da LTA mostram que a resposta terapêutica é satisfatória, sobretudo com relação à LC, com taxas de cura sempre acima de 60%, freqüentemente atingindo taxas de 80% ou 90%, em uma única série, com tendência à elevação destas taxas quando do uso de duas ou mais séries; algumas exceções nestes resultados parecem se relacionar ao tratamento em condições epidemiológicas específicas como em localidades com predomínio de espécies como *L. (V.) guyanensis* ou *L. (V.) panamensis* (BERMAN, 1996; BERMAN, 1997; MOSCOWITZ & KURBAN, 1999; HERWALDT, 1999; ROMERO et al., 2001).

As drogas de segunda escolha para o tratamento da LTA são a anfotericina B e a pentamidina, ambas também de utilização exclusivamente parenteral. As formulações de anfotericina B, tanto o desoxicolato como as formulações lipídicas mais recentes, são indicadas para situações de falha terapêutica ou pacientes com contra-indicação aos antimoniais, mas têm sido utilizadas principalmente no tratamento da LV resistente aos antimoniais, situação observada especialmente em algumas áreas endêmicas da Índia (SUNDAR et al., 2001; SUNDAR et al., 2004). A pentamidina tem sido utilizada como medicamento de primeira escolha em localidades onde há predomínio de *L. (V.) guyanensis* (LAI A FAT et al., 2002), porém como a espécie predominante no Brasil é a *L. (V.) braziliensis*, a pentamidina permanece como medicamento alternativo. Também é de uso restrito por requerer acompanhamento rigoroso de equipe especializada, uma vez que pode causar

reações durante a aplicação tais como hipoglicemia e hipotensão, e reação no local da aplicação quando administrada por via intramuscular (BERMAN, 1997; LAI A FAT et. al., 2002; DE PAULA et al., 2003; ANDERSEN et al., 2005), com o agravante de poder desencadear um quadro de diabetes insulino-dependente (Costa, 1993; COSTA et al., 1995).

1.3. JUSTIFICATIVA PARA AVALIAÇÃO DE ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS E DO USO DE IMUNOTERÁPICOS NO TRATAMENTO DA LTA. BREVE DISCUSSÃO DA IMUNOPATOGÊNESE DA DOENÇA.

Apesar da eficácia potencial dos esquemas convencionais de tratamento com os antimoniais, há fatores que limitam seu uso. Dentre eles, toxicidade, alto custo específico e adicional do tratamento, necessidade de esquemas terapêuticos prolongados para obter-se a cura, uso parenteral exclusivo, instabilidade química, falta de disponibilidade de métodos seguros para o controle de qualidade dos compostos comercialmente disponíveis, e até o surgimento de cepas de *Leishmania* primariamente resistentes. A busca de alternativas terapêuticas é necessária, considerando-se os diferentes cenários de ocorrência das leishmanioses, com dificuldades técnicas e operacionais tão diretamente vinculadas à boa assistência aos pacientes.

Quanto aos medicamentos hoje considerados como de segunda linha para tratamento das leishmanioses, a anfotericina B apresenta excelente eficácia no tratamento das diversas formas de leishmanioses, mas tem como fatores limitantes a necessidade de uso em ambiente hospitalar assistida por

equipe especializada e um rigoroso controle laboratorial, devido à toxicidade cardíaca e renal, causas freqüentes de hipocalemia e hipomagnesemia, entre outros. Além destes fatores, os esquemas propostos são geralmente de longa duração, o que acarreta aumento no custo e redução da adesão ao tratamento por parte do paciente. Mesmo as formulações lipídicas mais recentes, com potencial redução da freqüência de eventos adversos associados, também apresenta os inconvenientes do tempo prolongado de tratamento, uso parenteral e necessidade de seguimento com observação clínica e exames laboratoriais freqüentes. Sobre a pentamidina, são poucos os estudos de avaliação de eficácia e com variações nos esquemas terapêuticos, o que dificulta qualquer conclusão sobre o real papel da pentamidina hoje dentro do cenário de tratamento das leishmanioses. Também é medicamento de uso restrito em decorrência dos efeitos adversos citados.

Considerando-se que as drogas de primeira escolha e as de segunda linha atualmente disponíveis para tratamento da LTA têm níveis satisfatórios de eficácia, mas apresentam perfis que distam do conceito de droga ideal, principalmente pela toxicidade, necessidade de tratamento de longa duração, e custo elevado, buscou-se avaliar a eficácia de uma outra modalidade terapêutica. Trabalhos da literatura médica demonstrando a resposta clínica favorável quando da utilização de imunoterapia com antígenos de *Leishmania* spp utilizados como vacina para imunoprofilaxia da leishmaniose, motivaram a avaliação da eficácia desta modalidade de tratamento.

A interação do parasito com o hospedeiro e a conseqüente resposta imune desencadeada a partir deste encontro, definem a expressão clínica da

leishmaniose. O padrão da resposta imune a ser desenvolvido está diretamente relacionado à patogênese da LT. As citocinas são os componentes fundamentais na elaboração da resposta imune, sendo a IFN- γ um elemento central por ser o responsável pela ativação de macrófagos que podem desencadear mecanismos de destruição de leishmânias. A compreensão sobre o equilíbrio em sua produção e de fatores outros que regulam seus efeitos nos macrófagos, é fundamental para o desenvolvimento da imunoterapia e imunoprevenção das leishmanioses.

São descritos dois perfis clássicos de resposta imune que caracterizam a LTA como uma doença polar. No pólo positivo, representado pelas formas cutânea localizada, mucosa e "recidiva cutis", há um predomínio na expressão de citocinas tais como IFN- γ e IL-2, mas também de TNF- α , caracterizando um perfil Tipo 1 (Th1) de resposta imune celular. Este perfil parece conferir resistência ao indivíduo infectado e determina uma evolução clínica satisfatória que pode variar de uma infecção subclínica a uma doença branda, com evolução para cicatrização espontânea ou boa resposta terapêutica aos esquemas convencionais, especialmente nas formas cutâneas. No pólo negativo, representado pela LCD, os pacientes apresentam no sangue periférico o perfil Tipo 2 (Th2) de resposta celular com predomínio de citocinas tais como IL-4 e IL-5, e ausência de IFN- γ . Neste caso, os indivíduos apresentam maior suscetibilidade ao parasito, evoluindo com quadro clínico prolongado, geralmente refratário aos esquemas convencionais e apresentando recidivas freqüentes (CONVIT et al., 1972, 1989; CASTÉS et al., 1983; CARVALHO et al., 1985; BARRAL et. al., 1991, 1995). Observa-se que a LM estaria no pólo

positivo em relação ao padrão de resposta imune celular, porém com produção de anticorpos maior comparando-se à LC, sugerindo padrão misto de resposta imune. Considerando-se aspectos de evolução clínica, é uma forma de apresentação de difícil condução, com tendência à cronicidade.

Muitos dos fatores que determinam o perfil imune desenvolvido a partir da infecção permanecem obscuros, acreditando-se que a espécie do parasito e os fatores imunológicos e genéticos do indivíduo infectado possam ser determinantes para a resposta imune precocemente desenvolvida e conseqüente evolução clínica da LTA (SCOTT, SACKS & SHER, 1983; SCOTT et al., 1988; BOMFIM et al., 1996; RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998; BARRAL-NETTO et al., 1998; TURETZ et al., 2002). Na resposta do tipo 1 ocorre o controle da multiplicação de parasitos e de sua disseminação, mas este mesmo padrão inflamatório pode induzir mais ou menos dano tecidual, na dependência do equilíbrio desta resposta. Os pacientes com LC têm majoritariamente intradermorreação positiva e alta resposta linfoproliferativa. Nesses pacientes, as células mononucleares do sangue periférico secretam níveis elevados de IFN- γ e TNF- α e níveis baixos de IL-5 e IL-10 quando estimuladas com antígenos solúveis de *Leishmania*, sendo a célula CD4+ o tipo celular que contribui com a maior parte da produção de IFN- γ em sangue periférico e nos tecidos onde também há predomínio destas citocinas de resposta Th1 (PIRMEZ et al., 1993). Na doença ativa, há predomínio de células CD4+ em relação às células CD8+ e após o tratamento há um equilíbrio entre estas células, sugerindo um papel destas últimas na cura clínica (DA-CRUZ et al., 2002). A resposta inflamatória inicial, apesar de necessária no controle da progressão

da infecção, parece ser importante na formação da úlcera; mesmo a utilização de medicamentos em fases bem precoces pré-lesão não impediria o desenvolvimento da úlcera, devido à resposta já desencadeada (MACHADO *et al.*, 2002).

Assim, sabe-se que a resposta Th1 é fundamental para a ativação de macrófagos e síntese de produtos tóxicos para as leishmânias. A presença de grandes quantidades de citocinas regulatórias que reduzem ou eliminam a presença de IFN- γ contribuem para a disseminação do parasito; apesar de regular a multiplicação e disseminação do parasito, a resposta Th1 exacerbada se correlaciona com maior destruição tecidual. O desenvolvimento de resposta imune modulada parece ser a chave para o desenvolvimento de formas mais brandas, cicatrização espontânea e mesmo o não desenvolvimento de doença (infecção subclínica). A avaliação de indivíduos com evidências de infecção sem relato de doença, indica que a resposta tipo 1 modulada, com menor produção de IFN- γ e TNF- α , pode induzir proteção sem lesão tecidual (FOLLADOR *et al.*, 2002).

Estes perfis bem definidos de resposta imunológica, associados às formas clínicas e dividindo a doença em pólos distintos têm auxiliado na compreensão dos mecanismos de produção da doença, mas a complexidade da resposta imune nas leishmanioses ultrapassa certos conceitos. Pode-se considerar que a resposta imune desencadeada diante do parasito é o principal determinante da evolução da infecção, mais do que os fatores próprios da *Leishmania* relacionados à espécie ou cepa, mesmo que se reconheça que somente determinadas espécies são associadas à determinada forma de

doença. O fenótipo da resposta imune pode ter determinação genética. Uma evolução para uma forma grave anérgica refratária de doença é caracterizada por uma paralisia imune específica aos antígenos da *Leishmania* e há muito foi demonstrado *in vitro* que esses pacientes apresentam supressão de resposta linfocitária antígeno-específica (PETERSEN et al., 1984) e que a resposta favorável ao tratamento depende da recuperação da capacidade de resposta celular à *Leishmania* (CONVIT et al., 1989, 1993). Já as infecções por *Leishmania* do complexo *Viannia* com evolução crônica como úlceras cutâneas de difícil cicatrização e formas mucosas, se caracterizam por resposta imune celular exacerbada, desencadeada por fatores não de todo conhecidos. A célula mononuclear com função de fagocitose parece ser a determinante dessa resposta. Demonstrou-se que nos pacientes com formas crônicas os macrófagos diferenciados de células mononucleares de sangue periférico tinham maior suscetibilidade à infecção por promastigotas quando comparados aos indivíduos com formas subclínicas (ROBLEDO et al., 1994; WEIGLE & SARAVIA, 1996).

Os fatores determinantes da evolução natural da LT não são de todo conhecidos, pois os conceitos são muitas vezes firmados em estudos experimentais que não definem por completo a resposta no homem. Mas, o estado atual do conhecimento nos permite dizer que o padrão da resposta imunológica a ser desenvolvido frente à uma infecção por *Leishmania* irá determinar a expressão da doença individualmente, abrindo perspectivas para avaliação de tratamentos baseados em modulação de resposta imune.

1.4. REVISÃO HISTÓRICA DO USO DO LEISHVACIN® NA IMUNOPROFILAXIA E IMUNOTERAPIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

A utilização de substâncias capazes de desencadear ou preservar uma resposta imune celular protetora, perfil Th1, pode ser uma alternativa terapêutica para o tratamento da LTA. Diversas propostas de imunomodulação têm sido estudadas para profilaxia ou tratamento das leishmanioses, sem haver, entretanto, até o presente momento, a definição de qual substância utilizar, qual a dose e o tempo de tratamento ideal para se obter resultados satisfatórios, superiores ou semelhantes aos observados com o uso dos antimoniais pentavalentes (CONVIT et al., 1987; CONVIT et al., 1989; MODABBER, 1989; NASCIMENTO et al., 1990; ENGERS et al., 1996; BRETSCHKE et al., 2001).

Desde o início do século passado, a imunoterapia tem sido relatada como alternativa terapêutica para diversas doenças infecciosas. O primeiro relato do uso intencional de parasitos do gênero *Leishmania* para tratamento das leishmanioses, deve-se a DI CRISTINA & CORONIA (1912, apud Mayrink et al., 1992). Estes autores inocularam promastigotas mortas de leishmânias cultivadas em meios artificiais em pacientes portadores de LV, sem entretanto obterem resultados satisfatórios. Nesse mesmo ano, ROW (1912, apud MAYRINK et al., 1992) relata a cura de três pacientes portadores de Botão do Oriente após a utilização de imunoterapia. Posteriormente nas Américas, observa-se a realização de diversos ensaios utilizando parasitos mortos com fins profiláticos, ressaltando-se os estudos de PESSÔA & PESTANA (1940) e PESSÔA (1941). Estes

autores ressaltaram a possibilidade da utilização de parasitos mortos como uma alternativa terapêutica para as diversas formas de leishmanioses presentes no Brasil.

Entre 1940 e 1970, observa-se uma lacuna no estudo da imunoterapia das leishmanioses, até que na década de 70, o Laboratório de Leishmanioses, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais/ UFMG, desenvolveu uma vacina antileishmaniose tegumentar americana, constituída de formas promastigotas mortas por ultra-som (MAYRINK et al., 1978; MAYRINK et al., 1979). A vacina viria posteriormente a ser chamada de Leishvacin[®], mas já com modificações quanto às cepas componentes e o laboratório responsável pela produção da mesma, neste caso a Biobrás S/A.

Inicialmente, a vacina era composta de cinco cepas de *Leishmania* dermatrópicas, objetivando produzir um antígeno eficaz contra as infecções causadas pelas diversas espécies de *Leishmania* encontradas no Brasil e restante da América Latina. Posteriormente, por recomendação de um Comitê de Experts da OMS, a vacina passou a ser composta de uma única cepa de *L. (L.) amazonensis*, IFLA/BR/67/PH8. Esta decisão baseou-se na demonstração de que antígenos dessa espécie induziam resposta imunoestimuladora adequada, semelhantes à induzida por antígenos de *L. (V.) braziliensis*, espécie sempre preterida pela possibilidade de hiperestimulação da resposta imune o que poderia levar à ocorrência de lesões mucosas mutilantes (MAYRINK & MAGALHÃES, 1999a).

1.4.1. Imunoprofilaxia com o Leishvacin®: revisão dos trabalhos publicados

O primeiro ensaio clínico relatado utilizando a vacina policepa na imunoprofilaxia da leishmaniose, data de 1979, ainda com a vacina composta por cinco cepas de *Leishmania* spp. Foi incluído no estudo, um total de 1588 indivíduos com intradermorreação de Montenegro (IRM) negativa, residentes em área endêmica de LT do estado de Minas Gerais. Os indivíduos foram divididos em dois grupos, tendo sido 614 vacinados e 974 não vacinados. Os autores referiram conversão do teste de Montenegro em 78,4% dos indivíduos vacinados, fato este não observado no grupo de indivíduos não vacinados, quando avaliados três meses após o início do estudo (MAYRINK et al., 1979). Entretanto, ao longo dos anos subseqüentes, houve redução da incidência de LT na localidade onde se realizou a pesquisa, dificultando a interpretação dos resultados obtidos quanto à capacidade protetora da vacina.

MAYRINK et al. (1985) realizaram uma "campanha vacinal" no município de Viana-ES, objetivando conter um surto de LT que vinha sendo observado naquela localidade. Ao todo, foram incluídos 483 indivíduos, sendo 216 vacinados com duas doses de 0,24 mg/ml. Testados após 40 dias, 187 (86,6%) indivíduos apresentaram conversão da IRM contra nenhuma conversão nos não vacinados. Após 2 anos, a freqüência de doença nos não vacinados foi de 8,9% e nos vacinados, 1,7%.

Em 1981 e 1983, ANTUNES et al. (1986) realizaram um estudo duplo cego randomizado, utilizando a vacina em grupos de militares que estariam expostos à infecção por período limitado de tempo, com o objetivo de avaliar a eficácia profilática da vacina. A conversão de IRM foi observada em 33% dos

indivíduos vacinados em 1981 e em 70% daqueles vacinados em 1983, com uma taxa de proteção de 23% e 60% para cada ensaio, respectivamente. A baixa taxa de conversão observada nos indivíduos vacinados em 1981 foi atribuída ao pequeno intervalo de tempo transcorrido entre a aplicação da vacina antileishmaniose e outras vacinas, principalmente a vacina antiamarílica.

Em 1991, são realizadas duas reuniões para análise dos resultados até então relatados, com a participação da OPAS, OMS/ TDR e o grupo de pesquisadores responsáveis pela produção da vacina. Decidiu-se que a Indústria Biobrás S/A assumiria a produção em escala industrial sob condições G.M.P. (*Good Manufacturing Practices*) e com o compromisso de fornecimento da vacina para os ensaios clínicos subseqüentes. Inicialmente, a vacina produzida, agora com o nome registrado Leishvacin[®], era ainda composta de cinco cepas, mas por decisão do comitê técnico, passou a ser composta de uma única espécie, a *L. (L.) amazonensis*, cepa IFLA/BR/67/PH8.

Estudos clínicos de fase I (segurança/toxicidade), II (imunogenicidade) e III (eficácia), utilizando o produto em concentração de 0,24 mg/ml de nitrogênio, conservado em tiomersal 0,1 mg/ml em pH 7,4, foram, então, realizados, visando avaliar a vacina industrialmente produzida (MENDONÇA et al., 1993, 1995; HERMETO et al., 1994; MARZOCHI *et al.*, 1995; GENARO et al., 1996; DE LUCA et al., 1997, 1999; MARZOCHI et al., 1998). Os ensaios clínicos para avaliação da imunogenicidade da Leishvacin[®] demonstraram conversão significativa da resposta à IRM nos indivíduos vacinados, associada a uma produção de citocinas do perfil Th-1 da resposta imune celular, além de um

aumento da resposta linfoproliferativa de células mononucleares de sangue periférico, quando comparados aos indivíduos não vacinados (NASCIMENTO et al., 1990; MENDONÇA et al., 1993, 1995). Os estudos forma realizados tanto com a vacina policepa como monocepa.

DE LUCA et al. (1997) relataram ter havido uma elevada expressão de IFN- γ e IL-2, após administração de doses de 180, 360 e 540 μ g de N₂ proteico/ml de Leishvacin[®], em três grupos de voluntários saudáveis com IRM negativa; a dose de 360 μ g de N₂ proteico/ ml, aplicada em duas ou três injeções com intervalos de 21 dias, mostrou-se mais imunogênica, com maior elevação das citocinas avaliadas.

Estudos posteriores, avaliando a estabilidade e imunogenicidade da vacina Leishvacin[®] demonstraram que a vacina não autoclavada, preservada em temperatura de 4°C, mantinha sua imunogenicidade por período de até 5 anos (MENDONÇA et al., 1997; DE LUCA et al., 1999; MAYRINK et al., 1999).

Visando avaliar a freqüência de efeitos adversos e a toxicidade da vacina, realizou-se um ensaio clínico, utilizando esquemas de uma a três doses de Leishvacin[®], em elevadas concentrações, com intervalos de 7 a 21 dias entre as doses. Os autores relataram a ocorrência, apenas, de dor leve no local da aplicação, sem ocorrência de alterações laboratoriais nos exames realizados nos indivíduos vacinados, ressaltando a segurança da utilização do produto em seres humanos (MARZOCHI et al., 1995; MARZOCHI et al., 1998).

1.4.2. Imunoterapia com o Leishvacin[®]: revisão dos trabalhos publicados

A imunogenicidade e a segurança do Leishvacin[®] demonstradas nos estudos anteriores estimularam a realização de ensaios clínicos utilizando-o como imunoterápico em pacientes com LT.

CONVIT et al. (1987), após realização de um estudo comparativo entre a utilização de imunoterapia com vacina semelhante à descrita acima (BCG + promastigotas mortas de *Leishmania*) e quimioterapia convencional (antimonial pentavalente) relataram a ocorrência de efeitos adversos em 5,8 e 52,4% dos pacientes, respectivamente. A taxa de cura foi similar em ambos os grupos. Os autores destacaram o baixo custo e baixa toxicidade da imunoquimioterapia com vantagens sobre a terapia convencional com os antimoniais.

MICHALIK et al. (1987) referiram utilização de Leishvacin[®] (policepa), como imunoterápico em 22 pacientes portadores de LT, obtendo cura em 77,7% dos casos, após utilização de 3 a 10 séries de tratamento (60 a 200 dias). Os autores ressaltaram a possibilidade de utilização da Leishvacin[®] em pacientes portadores de LT que apresentassem contra-indicações para o uso de antimoniais ou formas clínicas consideradas refratárias.

Num segundo estudo clínico (MAYRINK et al., 1991; MAYRINK et al., 1992), foram tratados 62 pacientes com LT, 8 deles com lesões mucosas. A cura clínica foi obtida em 75,8% dos pacientes, após o uso de 2 a 19 séries.

A área referida nos estudos está localizada em Minas Gerais, no município de Caratinga, endêmico para LT. Nos dois estudos acima relatados, as séries eram de 10 dias, seguidas de 10 dias de intervalo. Os pacientes eram

examinados e, caso não houvesse cicatrização, reiniciava-se a série de medicamentos. Foi utilizada a vacina policepa e a forma de administração foi intramuscular no primeiro estudo e subcutânea no segundo (MAYRINK et al., 1991). Ao mesmo tempo em que os estudos com a vacina eram desenvolvidos, os pacientes não selecionados para os trabalhos eram tratados com Glucantime[®], sempre com séries de 10 dias e com dose diária preferencial de 2 ampolas por dia, independente do peso dos pacientes, mas com algumas referências a doses de 20 mg/Kg/dia, sem dose máxima relatada. Nas publicações originais dos estudos, não há referência a grupos controles, mas em relatório posteriormente apresentado pelos pesquisadores, os resultados obtidos com a vacina foram comparados com o observado nos pacientes em uso de Glucantime[®] e as taxas de cura foram semelhantes (TOLEDO et al., 1993).

Num outro estudo relatado num trabalho de revisão (GENARO *et al.*, 1996), foram tratados com a vacina por via subcutânea 60 pacientes, no mesmo esquema acima descrito. Um total de 95% dos pacientes obteve a cura, utilizando no máximo 20 séries (média de $7,6 \pm 4$ séries). Um grupo controle de 62 pacientes foi tratado com Glucantime[®], todos curados com o máximo de 9 séries (média de $4,0 \pm 1,4$ séries).

A partir de então, outros dois estudos foram desenvolvidos pelo mesmo grupo de pesquisadores, mas desta vez com o uso associado de Glucantime[®] com a vacina, inicialmente ainda a policepa e no segundo estudo já a vacina monocepa. O segundo estudo (MACHADO-PINTO et al., 2002) foi uma continuidade do primeiro, este apresentado em anais de congresso e referido

na revisão de GENARO et al. (1996), no qual 51 pacientes tiveram suas lesões cicatrizadas com o máximo de 7 séries, mas 90% tinham cura clínica com 4 séries. O grupo de 54 pacientes tratados com Glucantime[®] apresentou cicatrização das lesões com o máximo de 9 séries, sendo que 62% com 4 séries.

Os resultados do estudo acima estimularam a realização do estudo subsequente, um ensaio clínico randomizado, controlado e duplo-cego. Um total de 96 pacientes recebeu Glucantime[®] na dose de 8,5 mg/Kg/dia, associado a placebo ou a vacina monocepa Leishvacin[®], dessa vez utilizando uma dose maior do que as utilizadas nos estudos prévios, mas mantendo-se o tempo de 10 dias para cada série. Todos os 47 pacientes do grupo experimental apresentaram cura ao final de 4 séries, enquanto somente 4 de 49 pacientes do grupo controle (Glucantime[®]) curaram com o mesmo número de séries (MACHADO-PINTO et al., 2002).

1.5. JUSTIFICATIVA PARA AVALIAÇÃO DO LEISHVACIN[®] COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

Os ensaios clínicos acima relatados, com ou sem grupo controle ou randomização, apresentaram resultados satisfatórios com o uso da vacina para o tratamento da LTA, com eficácia similar e por vezes superior quando comparada ao antimonial, apontando para a possibilidade de tratamento por estimulação da resposta imune. A avaliação do uso do Leishvacin[®] (policepa e

monocepa) combinado ao antimonial pentavalente indicou também que a associação pode ser sinérgica, reduzindo a dose de antimonial necessária para obter-se a cura. Um dado importante é que não houve associação de eventos adversos com a imunoterapia, exceto algumas reações locais.

Mas, há fatores que devem ser considerados na análise desses resultados. A necessidade de esquemas terapêuticos de longa duração, principalmente quando do uso isolado do imunoterápico, é um fator limitante para a indicação de Leishvacin[®] como uma das drogas disponíveis dentro do pequeno arsenal terapêutico para tratamento da LTA. Os esquemas foram sempre mais prolongados do que o tratamento medicamentoso padronizado e recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil, representando uma desvantagem da utilização da imunoterapia quando se considera a operacionalização e a conseqüente adesão dos pacientes. A aplicação simultânea de dois medicamentos de uso parenteral por períodos tão prolongados até meses, também é um fator limitante quando da avaliação da imunoquimioterapia. Essa dificuldade adicional não deve ser subestimada, visto que a motivação para o tratamento por parte do paciente é fator fundamental para o sucesso da resposta terapêutica.

De qualquer forma, a perspectiva de utilização de uma imunoterapia eficaz quanto à resposta terapêutica, e também segura pela ausência de associação com eventos adversos sistêmicos, motivou a proposta de avaliação do uso do Leishvacin[®] no tratamento da LC. O estudo aqui apresentado foi conduzido com o objetivo de se avaliar a eficácia do Leishvacin[®] como imunoterapia (uso isolado da vacina) no tratamento na LC, em comparação

com o Glucantime[®], o antimonial pentavalente hoje disponível para uso nos serviços. A avaliação de um esquema terapêutico utilizando o Leishvacin[®] como uma única droga e em tempo igual ao utilizado numa série convencional com o Glucantime[®], responderia ao questionamento se a imunoterapia poderia ser indicada como tratamento regular da LC ou somente como uma opção para situações excepcionais. Mais ainda, considerou-se que uma resposta imune desencadeada por estimulação antigênica a partir do uso da vacina, poderia por hipótese se manter por tempo suficiente para induzir a cicatrização das lesões. A utilização de cada um dos tratamentos de forma isolada conduziria a uma melhor avaliação dos parâmetros de interesse.

2. OBJETIVOS:

Estimar a eficácia e a frequência de eventos adversos do Leishvacin[®] como imunoterapia na leishmaniose cutânea localizada (LCL).

Como objetivos específicos:

- Determinar e comparar a taxa de cura com a utilização do Leishvacin[®] e do Glucantime[®];
- Determinar o tempo até a cura com a utilização do Leishvacin[®] e do Glucantime[®];
- Determinar e comparar por observação clínica a incidência de eventos adversos com a utilização da Leishvacin[®] e do Glucantime[®];
- Comparar a incidência de alterações laboratoriais com a utilização do Leishvacin[®] e do Glucantime[®].

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. TIPO DE ESTUDO:

Trata-se de um estudo experimental, do tipo ensaio clínico randomizado, aberto e controlado, com controles ativos (POCOCK, 1987), ou seja, com grupo controle constituído de pacientes submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina, o medicamento de primeira escolha para as leishmanioses no Brasil (BRASIL, 2006; BRASIL, 2007). A realização do ensaio aberto deu-se em decorrência de que os medicamentos em comparação têm vias de administração distintas, fazendo com que o mascaramento fosse possível unicamente mediante a aplicação diária de duas injeções, ou seja, uma por via endovenosa e outra por via subcutânea, acarretando danos óbvios aos participantes selecionados. Diante da objetividade do desfecho a ser observado, cura ou falha terapêutica, sendo a cura neste caso a presença de cicatrização de lesão cutânea, ulcerada na grande maioria, considerou-se não haver justificativa para esta dupla administração parenteral diária de medicamentos, sem prejuízo para a avaliação do desfecho principal.

A avaliação final da resposta terapêutica foi realizada de forma aberta. Nos retornos agendados para avaliação clínica, durante e após a fase de aplicação da medicação, os pacientes eram avaliados por duas bolsistas do projeto, sendo uma médica e outra acadêmica cursando o internato de medicina na UFMT. Ambas foram submetidas a treinamento prévio, tanto para conhecimento das fases do projeto, como o correto preenchimento das fichas

individuais dos pacientes. A avaliação assistida pela pesquisadora principal incluía a anotação dos dados de evolução da doença, da presença ou ausência dos eventos adversos, estes relatados espontaneamente ou por questionamento, além da anotação dos resultados dos exames laboratoriais.

3.2. LOCAL DE ESTUDO:

O estudo foi realizado na cidade de Cuiabá, no Hospital Universitário Júlio Müller (HUJM), da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), que conta com um serviço de referência estadual para diagnóstico e tratamento das leishmanioses. O ambulatório de leishmanioses atende de 40 a 50 consultas semanais, dos quais 70% são confirmados como casos de leishmanioses. Os outros 30% são em sua maioria pacientes com lesões cutâneas ou mucosas, que apresentam como diagnósticos finais doenças como úlceras venosas, hanseníase ou micoses profundas, entre outras. Mensalmente, são realizados no serviço mais de 100 atendimentos de LT, sendo 70% de LC. Nos 20 meses do estudo, registrou-se uma frequência mensal aproximada de 13 casos novos de LT, com média de 9 casos novos de LC/ mês.

3.2.1 Condições para execução do projeto:

O Hospital Universitário Júlio Müller é referência para doenças infecciosas em Mato Grosso e especificamente para diagnóstico e tratamento das

leishmanioses desde 1993, com ambulatório e laboratório para exames parasitológicos com capacidade instalada para isolar *Leishmania* spp. utilizando métodos convencionais de cultivo. Atua ainda na capacitação de pessoal da área de saúde que necessite treinamento para prestar assistência aos pacientes com leishmanioses em outros municípios, em cooperação com a Secretaria Estadual de Saúde. Apresenta infra-estrutura física e laboratorial adequadas às necessidades do projeto, dispondo ainda de local próprio para aplicação diária dos medicamentos, inclusive nos finais de semana. A equipe auxiliar do serviço de referência é composta de enfermeiros e auxiliares de enfermagem aptos à execução da assistência complementar, como aplicação de medicamentos e curativos diários, distribuídos em períodos regulares e de plantão, com a finalidade de assegurar a continuidade das atividades.

3.3. PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO:

Foram 20 meses para a inclusão de pacientes, iniciando-se em novembro de 2004 e encerrando-se em junho de 2006. Antes deste período, realizou-se o treinamento da equipe envolvida no projeto; as análises finais do estudo foram iniciadas em setembro de 2006.

3.4. CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA:

A fórmula utilizada para o cálculo da amostra foi a de Pocock (1987), com o objetivo de estimar o número necessário de indivíduos em cada grupo de intervenção para se avaliar a diferença esperada entre o tratamento convencional e o tratamento experimental.

Fórmula:

$$n = \frac{p_1(100 - p_1) + p_2(100 - p_2) \times f(\alpha, \beta)}{d^2}$$

Onde :

n = número de indivíduos em cada grupo

p1 = taxa de cura esperada para o grupo controle

p2 = taxa de cura esperada para o grupo experimental

f (α,β) = função de α e β, cujo valor é fornecido por uma tabela estatística a partir da determinação dos valores de α e de β, que serão utilizados. Em nosso estudo estabeleceu-se α de 0.05% e β de 0.20%.

d = diferença máxima esperada entre os resultados dos dois esquemas terapêuticos que serão testados.

Analisando-se os trabalhos publicados de ensaios clínicos, estimou-se em pelo menos 60% a taxa de cura esperada com uma série de Sb⁺⁵ (BERMAN, 1988; ARANA et al., 1994; BERMAN, 1996; BERMAN, 1997; SALDANHA et al., 1999; DEPS et al., 2000) e em 80% a taxa de cura esperada para o Leishvacin[®] (MICHALIK et al., 1987; MAYRINK et al., 1992; MACHADO-PINTO et al., 2002).

Assumindo-se uma taxa de cura de 60% com uma série de Sb⁺⁵ e simulando taxas de cura com o Leishvacin[®] com diferença de 20% em relação ao Sb⁺⁵, ou seja, de 80% ou 40%, as amostras estimadas foram de 87 ou 104 pacientes em cada grupo, respectivamente, já considerada a perda de 10%.

3.5. DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

O desenvolvimento das atividades do estudo seguiu o cronograma esquematizado no **Anexo 4**, com as seguintes etapas:

3.5.1. Definição de caso

Diante de um caso suspeito de leishmaniose cutânea (LC) foram realizados os exames parasitológicos e a intradermorreação de Montenegro (IRM).

Considerou-se caso suspeito de LC:

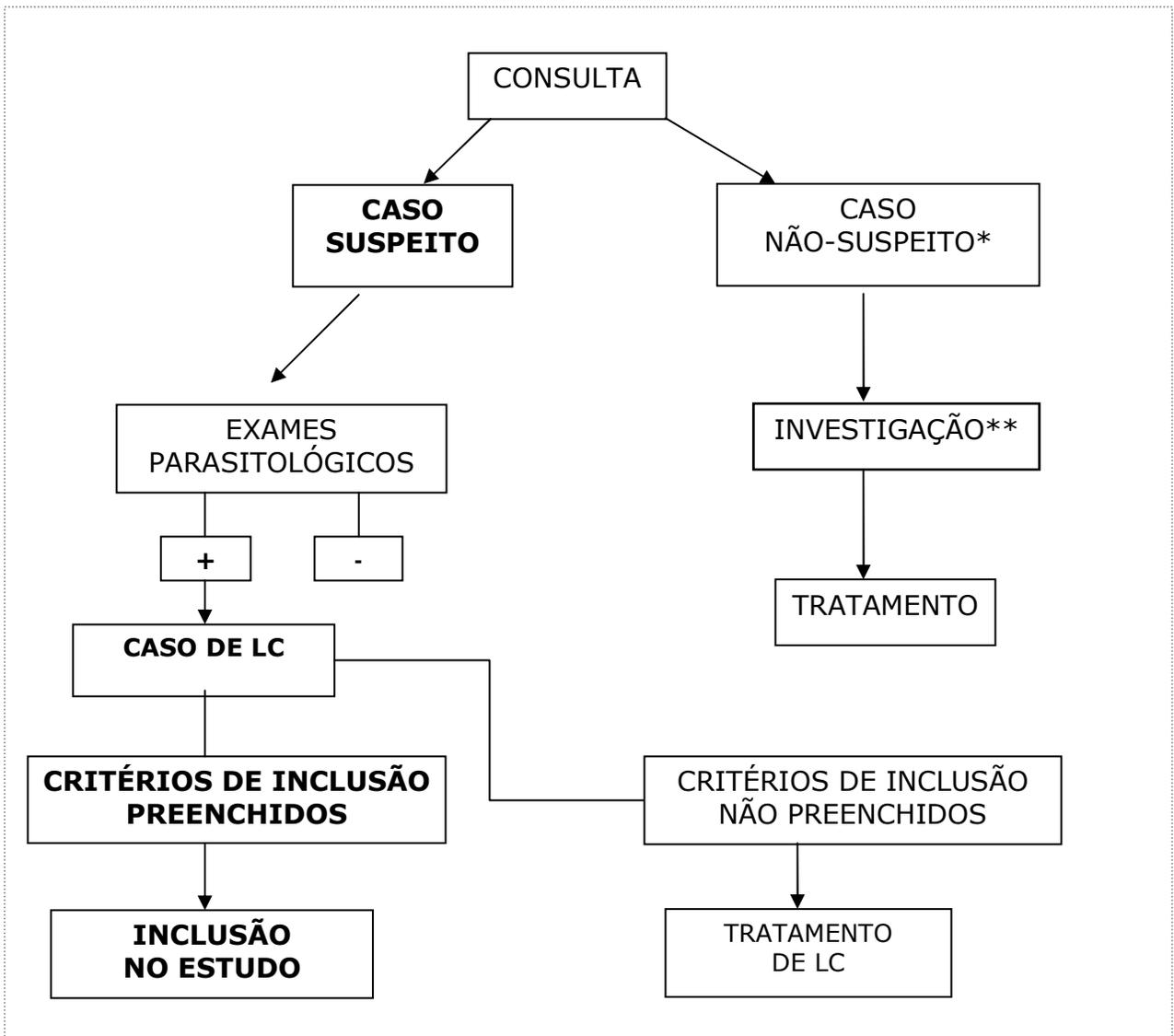
- Todo paciente com lesão cutânea ativa em evolução há 4 semanas ou mais, de aspecto sugestivo – única ou múltipla, na forma de úlcera com bordas infiltradas em moldura – ou lesões sem aspecto característico – lesões vegetantes, em placa, verrucosas, pápulo-nodulares - e com relato de exposição à situação definida de risco para a infecção, como residência ou contato com áreas conhecidas

de transmissão, guardando-se a relação temporal para o desenvolvimento da doença, aqui considerado até um ano.

Considerou-se caso de LC:

- Todo paciente com lesão cutânea em atividade e presença de ao menos um dos exames parasitológicos positivos para *Leishmania* spp.

Figura 2. Fluxograma para atendimento e definição de caso de LC.



*Todo caso com lesão cutânea que não preenchesse os critérios de caso suspeito, definidos em 3.5.1.

** Investigação dirigida à hipótese(s) diagnóstica.

3.5.2. Critérios de inclusão, não-inclusão, exclusão após randomização, retirada do estudo e perda

Com a finalidade de assegurar a semelhança entre os dois grupos e para facilitar a inferência causal, foram elaborados os critérios detalhados a seguir:

Critérios de inclusão:

- Preencher os critérios para definição de caso;
- Ter idade entre 10 e 65 anos;
- Ter endereço fixo;
- Ter LC com no máximo 6 lesões de pele;
- Ter de 4 semanas a 6 meses de evolução das lesões;
- Ter somente lesões cutâneas de leishmaniose, sem evidências de comprometimento mucoso ao exame físico;
- Aceitar ser submetido ao tratamento supervisionado;
- Assinar o termo escrito de consentimento livre e esclarecido, o paciente ou a pessoa responsável no caso de menores de idade (**Anexo 2**).

Critérios de não-inclusão:

- Apresentar história prévia de leishmaniose tegumentar;
- Relatar tratamento prévio com antimoniais pentavalentes ou com drogas de segunda linha no tratamento das leishmanioses (pentamidina ou anfotericina B), nos últimos seis meses;
- Apresentar evidência de cardiopatia ao exame clínico ou ao eletrocardiograma (ECG);
- Apresentar evidência clínica ou exames complementares compatíveis com nefropatia, hepatopatia ou doença pancreática;
- Apresentar qualquer uma das seguintes doenças: tuberculose, hanseníase, câncer e diabetes mellitus ou outra doença grave;
- Uso sistêmico de corticosteróides ou outro imunossupressor;
- Mulheres em idade fértil, com atraso menstrual sem causa estabelecida ou com diagnóstico de gravidez confirmado clínica e laboratorialmente.

Critérios para exclusão após randomização:

- Não comparecer para receber o esquema terapêutico ou não dar continuidade ao tratamento após a primeira dose administrada, após ter preenchido os critérios de inclusão, ter aceitado submeter-se ao tratamento supervisionado e ter assinado o termo de consentimento livre e esclarecido.

Critérios para retirada do estudo:

- Intolerância ao esquema terapêutico (presença de eventos adversos moderados que não responderam a sintomáticos ou graves que impeçam a continuidade do esquema terapêutico, segundo classificação estabelecida em capítulo posterior).
- Não aderência ao protocolo: falha na administração de três doses consecutivas ou necessidade de mais de 30 dias para realização do tratamento;
- Solicitação expressa do paciente para se retirar do estudo.

Definição de perda:

- Definiu-se como perda todo paciente com critérios para retirada do estudo, segundo descrição acima.

3.5.3. Atendimento inicial:

Na primeira consulta, os pacientes com suspeita de leishmaniose cutânea foram submetidos à avaliação clínica completa, conforme atendimento rotineiro do ambulatório de referência. Foi indicada a investigação diagnóstica com orientação sobre os procedimentos que seriam realizados naquele mesmo dia da consulta.

Estabeleceu-se como procedimento padrão de anti-sepsia a limpeza das lesões com solução de iodo e lavagem exaustiva com soro fisiológico, antes da realização dos exames específicos.

Para a realização dos procedimentos diagnósticos foi utilizada sempre que possível, a lesão de menor tempo de evolução e a área mais infiltrada da borda da lesão.

3.5.4. Procedimentos diagnósticos específicos:

3.5.4.1. Intradermorreação de Montenegro (IRM)

Para realização da IRM, foi utilizado antígeno fornecido pelo Instituto Biomanguinhos/ FIOCRUZ - Rio de Janeiro, encaminhado ao Serviço de Referência através da Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso. O antígeno de Montenegro neste preparado é obtido a partir da cepa *L. amazonensis*, diluído em uma suspensão de salina fenolada a 0,4% (40 micrograma de pt nitrogenada/ml), concentração de proteína padronizada por MELO *et al.* (1977).

O teste consistiu na reação intradérmica, inoculando-se 0,1ml do composto antigênico na face anterior do antebraço. A leitura foi realizada 48 horas após a realização do teste, com a técnica da caneta esferográfica descrita por Sokal (WHO, 1990), acrescentando-se o decalque em papel para arquivo em prontuário médico. Considerou-se reator ou positivo o teste com endurecimento igual ou superior a 5mm em seu maior diâmetro.

3.5.4.2. Raspado para exames parasitológicos

- **Esfregaço em lâmina:** O exame de raspado foi realizado na borda interna da lesão cutânea selecionada para o procedimento, utilizando-se uma lâmina estéril de bisturi. Em uma única lâmina previamente desengordurada procedeu-se um total de 3 esfregaços, feitos com movimentos circulares, obtidos a partir de 3 raspados de locais diferentes da borda. A lâmina foi encaminhada ao laboratório próprio do Serviço de Referência no HUJM, fixada e corada (Giemsa) e examinada por uma única técnica de laboratório responsável pelos exames no serviço.

3.5.4.3. Aspirado de borda externa de lesão

- **Esfregaço em lâmina** – O exame de aspirado foi realizado sempre a partir da borda externa da lesão selecionada, no local de maior infiltração. A anti-sepsia do local foi realizada limpando-se inicialmente a área com solução tópica iodada e posteriormente solução salina a 0,9%; a área limpa foi infiltrada com anestésico (lidocaína 2%), e a aspiração foi realizada utilizando-se um citoaspirador acoplado a uma seringa de 20 ml e uma agulha descartável de 25x7 ou 30x7. Um primeiro aspirado foi utilizado para confecção de um esfregaço em lâmina previamente

desengordurada. A lâmina foi encaminhada, conforme descrito em RASPADO no item 3.5.4.2.

- **Cultura de Aspirado** - Um outro aspirado foi realizado com a mesma técnica descrita acima, para ser inoculado em meio de cultura apropriado. Foi utilizado um meio bifásico descrito por EVANS (1989), modificado, preparado no laboratório do HUJM. A fase sólida foi constituída por *Bacto Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) (DIFCO, USA) e 15% de sangue de coelho, desfibrinado por agitação em frasco com pérolas de vidro; o agar era misturado ao sangue e distribuído em tubos de ensaio de 12x100 mm (2,5 ml por tubo), fechado com tampa de borracha, conservando-os inclinados durante a solidificação do meio. A fase líquida do meio era constituída de 0,3 ml de *Bacto Brain Heart Infusion* (BHI), acrescidos de 20 UI de penicilina cristalina e 400 µg de estreptomicina, por mililitro de meio. A fase sólida do meio foi mantida em refrigerador a 4°C (2-8°C), sendo a fase líquida adicionada no dia de seu uso. O meio era desprezado quando não utilizado, num prazo de quinze dias. Os tubos com meio inoculado por material biológico eram acondicionados em estufa B.O.D. e mantidos em temperatura de 24°C. O conteúdo líquido semeado era examinado a cada 5-7 dias, e foi considerado positivo quando visualizadas formas promastigotas de *Leishmania* spp., independente de quantidade. Caso o material permanecesse negativo após 1 mês da data do exame, era

desprezado. Os isolados positivos foram acondicionados e encaminhados para caracterização da cepa por isoenzimas e PCR no Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses do Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - RJ, coordenado pela Dra. Elisa Cupolilo.

3.5.4.4. *Biópsia*

Após realização de anti-sepsia e anestesia local como descrito em ASPIRADO no item 3.5.4.3., foi realizada a biópsia utilizando-se “punch” descartável de 4 ou 6mm, sendo obtidos dois fragmentos no procedimento. Um deles era diretamente inoculado para cultivo *in vitro*, enquanto o outro era subdividido para exame parasitológico direto, exame de caracterização de *Leishmania* por técnica de PCR e exame histopatológico.

- **Exames parasitológicos**

- Cultura de Fragmento: um primeiro fragmento obtido por biópsia foi inoculado em meio de cultura apropriado (descrito em ASPIRADO no item 3.5.4.3.). O exame das culturas era realizado a cada 5-7 dias, sendo considerado positivo quando se observou a presença de formas promastigotas de *Leishmania* spp. O encaminhamento das amostras foi realizado como descrito em ASPIRADO no item 3.5.4.3.

- Imprint: o segundo fragmento foi dividido em 2 partes por um corte sagital. A primeira metade foi dividida mais uma vez e um dos fragmentos resultantes foi utilizado no *imprint*. O excesso de sangue foi absorvido em papel filtro e em lâmina previamente desengordurada, foram feitos vários movimentos de pressão para aposição do fragmento da biópsia sobre a superfície da lâmina. A lâmina foi acondicionada e encaminhada conforme descrito em RASPADO no item 3.5.4.2.

- **Identificação de *Leishmania* spp. por Reação em Cadeia da Polimerase e análise de polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição (PCR-RFLP ou Polimerase Chain Reaction– Restriction Fragment Length Polymorphism)**

– Uma das partes do segundo fragmento foi acondicionada em criotubo e armazenada a -20°C , para posterior exame de PCR. Foi necessário o encaminhamento das amostras para o laboratório referência citado em CULTURA DE ASPIRADO no item 3.5.4.3, sendo o transporte realizado com o material acondicionado em vasilhame térmico de isopor preenchido com placas congeladas, de forma a chegarem ao destino ainda congeladas. O DNA foi extraído usando-se WizardTM Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA), seguindo-se as instruções do fabricante. O método baseado na PCR utilizado para a identificação de *Leishmania* foi o

PCR-RFLP da região ITS1 do rDNA (SCHONIAN *et al.* 2003), empregando-se em cada reação 0,20 µM de cada *primer*, 1,5 U de *Taq* polimerase e 1,5 mM MgCl₂, seguido de 1 ciclo de 4 min à 94°C e 35 ciclos à 94°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 40 s, e então finalmente um ciclo extenso à 72°C por 8 min. Os produtos da PCR de ITS1rDNA foram digeridos com enzimas de restrição *Ecor1* e *Sau3AI* e subseqüentemente submetidos a eletroforese em *GenePhor apparatus* (GE Healthcare) usando um gel de poliacrilamida 12.5% (GeneGel; GE Healthcare). Algumas modificações foram introduzidas nos protocolos anteriormente descritos. No experimento direcionado à separação entre parasitos *L. (Viannia)* e não-*L. (Viannia)*, foram utilizados 50 pmol/µl de primer ISVC e 10 pmol/µl do ISVA, 2 U de *Taq* polimerase e 2 mM de MgCl₂. Adotou-se um ciclo inicial de PCR à 94°C por 4 min, seguido por 30 ciclos à 94°C por 30 s, 60°C por 1 min e 72°C por 30 s, seguido por um ciclo final à 72°C por 8 min.

3.5.5. Atendimento clínico após confirmação parasitológica para abordagem sobre inclusão no estudo

Nesta consulta, os pacientes com diagnóstico já confirmado de leishmaniose cutânea e com critérios de inclusão atendidos foram convidados a participar do estudo, mediante explicação dos procedimentos, dos objetivos e responsabilidade consensual na participação do estudo. Em caso de recusa, o

paciente foi atendido como habitualmente no ambulatório. Quando consentido, o paciente foi submetido a uma avaliação clínica completa, durante a qual foi preenchida uma ficha clínica própria (**Anexo 3**). Foram coletados dados de identificação pessoal, de antecedentes pessoais e familiares, além de se proceder a um exame físico completo do paciente, objetivando detectar clinicamente possíveis alterações cardiovasculares, renais, hepáticas, pancreáticas ou neurológicas periféricas. Atenção especial foi dirigida ao exame da cavidade nasal, realizado com iluminação direta e espéculo nasal se necessário. Foi avaliada a existência de adenopatia satélite, considerada como a presença de linfonodos palpáveis, maiores de 1 cm, guardando relação anatômica com a lesão.

As lesões cutâneas foram examinadas em detalhes, determinando-se tipo, localização, número e os maiores diâmetros longitudinal e transversal da área da úlcera, quando a lesão assim se apresentava. Foi questionada a realização de curativos caseiros, com ou sem uso de substâncias com princípio ativo conhecido ou natural.

Os dados laboratoriais iniciais foram também registrados na ficha clínica.

3.5.6. Randomização

Após o cadastramento e realização dos procedimentos diagnósticos e de avaliação cardíaca, renal e hepática, os pacientes foram alocados por randomização em bloco, cada bloco contendo alocação para 40 pacientes distribuídos igualmente em grupo experimental e controle. A alocação dentro

de cada bloco foi feita utilizando-se o GraphPad Software – QuickCalcs¹ e realizada por uma profissional médica não vinculada ao projeto. Essa mesma pessoa organizou envelopes seqüenciais em número de 40 por bloco e internamente colocou uma etiqueta com a inscrição do grupo de intervenção sorteado. Somente após a concordância na participação do estudo é que o envelope foi aberto para conhecimento da intervenção à qual o paciente seria submetido, até então desconhecida de ambos, pesquisador e paciente. O objetivo da randomização por blocos foi o de se assegurar a distribuição homogênea entre os dois grupos durante todo o estudo, mesmo considerada a possibilidade, eventual na ocasião, de interrupção do estudo diante de resultados da análise intermediária.

3.5.7. Intervenção Terapêutica

- **GRUPO L (experimental):** Leishvacin®: 0,1ml/dia, dose única diária, durante 20 dias, via subcutânea, na região deltóide.
- **GRUPO G (controle):** Glucantime®: 15mgSb⁺⁵/kg/dia, dose única diária, durante 20 dias, endovenoso, diluído em 200 ml de soro glicosado, administrado em 1 h, observando-se a completa aplicação do conteúdo do equipo.

1 - www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm

No grupo experimental foi utilizado Leishvacin[®] PH 8, produzido pelo laboratório Biobrás (Minas Gerais, Brasil), em condições GMP (*Good Manufacturing Practices*). Trata-se de um produto monovalente composto de formas promastigotas mortas de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8). A concentração do produto é de 0,24 mg/ml de nitrogênio conservado em tiomersal 0.1mg/ml, apresentado em frascos contendo 10,5 ml do produto. Foi utilizado, em todos os pacientes o mesmo lote 9031033-1V, mantido acondicionado em temperatura de 4 a 8° c.

O antimoniato-N-metilglucamina utilizado, Glucantime[®], é manufacturado pelo laboratório Aventis (São Paulo, Brasil) e comercializado para o Ministério da Saúde do Brasil. É distribuído aos Estados brasileiros através do Departamento de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) – MS. É apresentado em ampolas de 5 ml, contendo cerca de 1,5g do sal bruto e 81mg Sb⁺⁵/ml. Todos os pacientes do grupo controle receberam medicamento do Lote 402146, com data de validade de 05/2009, sendo as ampolas mantidas acondicionadas entre 4 a 8 °C.

A aplicação dos medicamentos, no grupo experimental ou no grupo controle, foi feita de forma supervisionada, sendo todo o tratamento administrado no próprio serviço, no HJUM, inclusive aos sábados, domingos e feriados. O tratamento tópico com limpeza e curativo oclusivo era realizado também diariamente.

3.5.8. Avaliação clínica e por exames complementares no período de tratamento:

3.5.8.1. Avaliação Clínica

As consultas foram agendadas para os dias 10, 20, 50, 80 e 110 (D10, D20, D50, D80 e D110), dias estes relativos ao primeiro dia de uso da medicação. Os pacientes do estudo tinham consigo um cartão de identificação que continha os telefones particulares da pesquisadora principal, assim como das duas auxiliares da pesquisa, de forma que sempre pudessem ser localizadas em caso de necessidade. Os pacientes eram submetidos a avaliação clínica completa na consulta, durante a qual se prosseguia no preenchimento da ficha clínica (**Anexo 3**). As lesões cutâneas foram examinadas em detalhes quanto à sua progressão. Foi realizada uma documentação fotográfica evolutiva das lesões, aproximadamente em D10, D20, D50, D80 e D110, sempre se considerando como tempo "0" ou D0 o dia de início do tratamento. Os dados laboratoriais foram apresentados ao examinador em cada consulta e registrados na ficha clínica.

3.5.8.2. Avaliação laboratorial

De cada paciente foi coletada uma amostra de 5 ml de sangue venoso periférico, em tubo seco, tipo "vacutainer", para processamento da análise bioquímica no Laboratório de Análises Clínicas do HUJM/UFMT. Foram

realizadas dosagens séricas de aminotransferases, fosfatase alcalina, uréia, creatinina e amilase, além do hemograma e contagem de plaquetas.

Esta avaliação foi realizada antes do início do esquema terapêutico, um, dois ou três dias antes das consultas de D10 e D20, sendo repetida após um mês, coincidindo com a avaliação de D50, caso alguma alteração tivesse sido detectada anteriormente (**Anexo 4**). O responsável pela análise bioquímica desconhecia o tratamento ao qual o paciente foi submetido, bem como a seqüência de coleta das amostras.

3.5.8.3. Avaliação por Eletrocardiograma (ECG)

Os exames de eletrocardiografia seqüenciais foram realizados na mesma freqüência da avaliação laboratorial acima descrita.

O exame foi realizado por um técnico de enfermagem do HJUM. Quatro exames, em média, foram realizados por paciente, com a mesma periodicidade descrita para avaliação clínica e laboratorial (**Anexo 4**).

A leitura dos eletrocardiogramas foi realizada pela pesquisadora principal, a cada consulta, com a finalidade de observação de eventos adversos surgidos após o início do tratamento e que eventualmente indicassem a suspensão do mesmo. Na ausência da pesquisadora, os ECG eram avaliados pelas bolsistas do projeto e em caso de dúvida era contatado o profissional médico preceptor mais próximo.

Foi programada outra avaliação para análise detalhada dos ECG seqüenciais, desta vez por especialista, mas sem data definida.

3.5.9. Avaliação da resposta terapêutica

3.5.9.1. Seguimento clínico

O seguimento clínico dos pacientes foi realizado nos dias 0, 10, 20, 50, 80 e 110 do protocolo (**Anexo 4**). A avaliação evolutiva da resposta terapêutica conduziu à conclusão quanto ao desfecho principal em análise, ou seja, definição pela falha terapêutica ou cura clínica da(s) lesão(ões).

3.5.9.2. Avaliação da incidência de eventos adversos

Definiu-se como evento adverso a presença de alterações ao exame clínico ou aos exames complementares não detectadas na primeira consulta e que ocorreram durante a realização do esquema terapêutico. Os parâmetros para determinação dos valores normais na análise bioquímica foram pré-estabelecidos pelo laboratório de análises clínicas do HUJM.

- **Avaliação clínica dos eventos adversos:** Durante a avaliação evolutiva o paciente foi interrogado a respeito do aparecimento de possíveis eventos adversos relacionados ao tratamento que foram anotados na ficha clínica (**Anexo 3**). O exame clínico foi realizado e as eventuais alterações foram registradas.

- **Avaliação dos eventos adversos por exames complementares:** Os pacientes eram avaliados segundo o cronograma estabelecido no **Anexo 4**.

- **Classificação dos eventos adversos**

- Eventos adversos leves: Presença de sinais ou sintomas relacionados com o uso do medicamento, mas que puderam ser tolerados pelo paciente, sem necessidade de uso de medicamentos sintomáticos, nem de interrupção da terapêutica específica.
- Eventos adversos moderados: Sinais ou sintomas relacionados ao esquema terapêutico que puderam ser tolerados pelo paciente, mas com o uso de medicamentos sintomáticos. Não foi necessária a interrupção do esquema terapêutico específico.
- Eventos adversos graves: Sinais ou sintomas não contornáveis a não ser com a suspensão da medicação específica (alterações da função renal, hepáticas ou cardíacas, e outros não toleráveis de ordem clínica).

3.5.9.3. Parâmetros de resposta terapêutica

Foram consideradas as seguintes definições na avaliação da evolução clínica da lesão (**Anexo 3**):

- **Cura Clínica** – foi definida pela presença de epitelização das lesões, com regressão total da infiltração e eritema, sem qualquer outra evidência de atividade, no período de 3 meses a partir da conclusão do esquema terapêutico, conforme a definição do Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (BRASIL, 2000 e 2007). Acrescentou-se a ausência de linfadenopatia anatomicamente relacionada à cicatriz.
- **Melhora** – foi definida pela presença de epitelização parcial, com diminuição, porém persistência, do infiltrado das bordas da lesão, associada à presença de tecido de granulação no fundo da lesão, com ou sem presença de crostas, observada durante o período de seguimento clínico, 3 meses após a conclusão do esquema terapêutico.
- **Sem Melhora** – foi definida pela ausência dos sinais de melhora clínica das lesões, ou mesmo aumento dos sinais de atividade clínica em relação ao exame anterior, como a piora da infiltração, do eritema e aumento da área de úlcera; também quando do surgimento de novas lesões em qualquer fase do seguimento clínico.

3.5.9.4. Desfechos clínicos primários

Os desfechos possíveis para os pacientes incluídos no estudo foram cura e falha, definidos como:

- **Cura** – presença de epitelização das lesões, com regressão total da infiltração e eritema, sem qualquer outra evidência de atividade, em qualquer fase do seguimento clínico, dentro do período de 3 meses a partir da conclusão do esquema terapêutico. Somente pacientes com cura clínica em algum momento do seguimento, segundo os parâmetros de resposta terapêutica acima descritos, foram considerados para este desfecho.

- **Falha** - Qualquer outra evolução clínica da lesão, diferente das definições de cura, quando do término do período de observação de 3 meses a partir da conclusão do esquema terapêutico, incluindo-se os parâmetros de resposta terapêutica “melhora” e “sem melhora” acima descritos. Incluem-se ainda as situações de recidiva e disseminação, definidas como:
 - Recidiva: reativação de uma lesão previamente cicatrizada ou que tenha apresentado sinais iniciais de melhora clínica.
 - Disseminação: aparecimento de lesão mucosa ou nova(s) lesão(ões) cutânea(s), independente da evolução clínica da(s) lesão(ões) primária(s).

O paciente com falha como desfecho foi submetido a um novo esquema terapêutico. Caso fosse do grupo experimental, recebeu uma série de antimonial pentavalente, na dose de 15mg Sb⁺⁵/kg/dia, via EV, dose única diária, durante 20 dias; se do grupo controle, recebeu uma nova série do antimonial pentavalente, na dose de 20mg Sb⁺⁵/kg/dia, dose única diária, durante 30 dias. Se a falha fosse por disseminação ou surgimento de novas lesões, o medicamento seria substituído por outro considerado como alternativo ou de segunda escolha, em vista desta evidência de resistência terapêutica.

3.6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi elaborado segundo as diretrizes éticas internacionais para pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos, de acordo com as Resoluções 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde- MS-Brasil, e aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Muller da Universidade Federal de Mato Grosso (PROTOCOLO N^o. 144/CEP/HUJM/04). Antes da inclusão na pesquisa, os pacientes foram esclarecidos quanto ao conteúdo e objetivos do estudo, e convidados a assinar um termo de consentimento livre e esclarecido, no qual constavam todas as informações sobre a pesquisa, incluindo exames e tratamentos a que seriam submetidos. Foram orientados quanto à garantia de que continuariam a receber a devida assistência médica, caso se recusassem a fazer parte do

estudo ou que dele quisessem se retirar. A assinatura do termo foi considerada critério de inclusão no estudo (**Anexo 2**).

Os telefones pessoais da pesquisadora principal e das auxiliares diretas da pesquisa foram disponibilizados aos participantes, visando a possibilidade permanente de contato com as mesmas para atendimentos ou orientações quando necessárias. Também foi assegurado o acesso ao setor de pronto atendimento do hospital, para eventuais intercorrências.

Na indicação de retratamento, os pacientes receberiam assistência de igual qualidade, sendo preservado o direito de receberem medicação, realizarem consultas médicas e exames complementares no mesmo serviço.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados nas fichas clínicas foram registrados em um banco de dados, criado no programa EPI-Info, versão 6.04d, (*Center for Diseases Control. Epidemiology Program Office, Atlanta, Georgia*). Inicialmente, os dados foram tabulados e a distribuição das características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais dos pacientes foi descrita para os dois grupos de tratamento.

A partir do banco de dados foram realizados os testes estatísticos necessários para determinação da significância das diferenças de médias (teste t de Student e análise de variância) e de proporções (teste de Fisher e teste do qui-quadrado) encontradas entre diferentes variáveis e os grupos de

tratamento. Para todas as análises foi fixado o limite de significância igual a 0.05.

Para a apresentação das características gerais demográficas e clínicas dos pacientes nos dois grupos de intervenção, optou-se pela apresentação dos dados numa tabela, mas sem a aplicação de métodos estatísticos para comparação das características entre os grupos. A randomização não assegura, mas contribui para uma distribuição homogênea entre os grupos. Diferenças eventuais podem ocorrer ao acaso e ausências de diferenças em análises estatísticas também não asseguram a homogeneidade entre os grupos. Assim, compreendeu-se que a análise estatística não se aplicaria (ALTMAN & DORÉ, 1990; SCHULZ & GRIMES, 2002).

A análise do desfecho principal do tratamento dos pacientes foi feita pela comparação dos coeficientes de incidência de cura e falha de cada grupo, a partir de duas abordagens:

Análise *per* protocolo: somente os pacientes com desfecho constatado por completa adesão ao protocolo foram considerados para esta análise.

Análise por intenção de tratar: todos os pacientes incluídos foram analisados, mesmo aqueles considerados como perda por não terem seguimento adequado para a constatação do desfecho principal (DEFINIÇÃO DE PERDA em 3.5.2).

Para quantificar a associação entre o desfecho observado e o grupo de tratamento, foram determinados os riscos relativos (e respectivos intervalos de confiança 95%) de falha e de cura no grupo experimental, assim como o excesso relativo de risco de falha terapêutica.

Para avaliar o efeito do tempo de seguimento sobre a probabilidade estimada de permanecer sem falha terapêutica entre os grupos de tratamento, foi construída uma curva de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier. O tempo de acompanhamento foi registrado em semanas a partir do primeiro dia de tratamento e o registro não diário pode ter interferido no cálculo da média de tempo para a ocorrência de falha. As perdas de seguimento foram consideradas como falha terapêutica.

Para avaliar a independência do efeito do tratamento instituído sobre a resposta terapêutica observada, foi feita uma análise exploratória da associação de características clínico-laboratoriais com os desfechos de cada grupo de tratamento. Posteriormente, os fatores que nessa análise apresentaram associação com a falha terapêutica (nível de significância de 0,10) foram incluídos em um modelo de regressão logística para análise multivariada. Sexo e idade, por serem variáveis potencialmente relacionadas à resposta terapêutica, foram também incluídas no modelo. A independência de associação entre a variável independente (grupo de tratamento) e a falha terapêutica foi mensurada pela Odds Ratio (OR) e respectivo IC95%.

Os eventos adversos observados durante o estudo foram descritos para cada grupo de tratamento. Para comparar a incidência de eventos adversos em decorrência do tratamento recebido foi estimada a diferença absoluta de risco e seu intervalo de confiança (95%) para cada sinal ou sintoma identificado como efeito adverso. Para as determinações laboratoriais, foi feita uma análise comparativa das médias dos valores de creatinina, fosfatase alcalina, alanina-

aminotransferase, hematócrito, leucócitos, neutrófilos e plaquetas observados em cada grupo de tratamento nos dias D0, D10 e D20 de seguimento.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AMOSTRA

O cálculo inicial da amostra indicou a inclusão de 87 ou 104 pacientes em cada grupo de intervenção terapêutica (CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA - item 3.4.). Numa análise intermediária não programada inicialmente, os resultados foram conclusivos com relação ao desfecho final e optou-se pela interrupção do estudo. Razões éticas impediram a sua continuidade. Até então, 69 pacientes tinham sido incluídos no estudo.

No período de novembro de 2004 a junho de 2006 foram atendidos 2240 casos de leishmaniose tegumentar no ambulatório de leishmanioses do Hospital Universitário Júlio Müller (HUJM). Um total de 1568 (70,0%) eram casos de leishmaniose cutânea (LC), sendo 178 (11,4%) casos novos, ou seja, sem investigação diagnóstica ou tratamento prévio (Tabela 1). Dentre estes, não foram alocados no estudo 109 pacientes que não atendiam aos critérios de inclusão, principalmente disponibilidade de permanecer no serviço para administração supervisionada de medicamentos, seguida da concordância de comparecimento aos retornos após os 20 dias de administração dos medicamentos. Cumpriram os critérios de inclusão 69 pacientes, randomizados para os dois grupos de tratamento, 36 (52,2%) para tratamento com Leishvacin[®] (grupo L) e 33 (48,8%) para Glucantime[®] (grupo G). Três pacientes (4,3%) do sexo masculino, com idade variando de 29 a 45 anos, com exames parasitológicos e IRM positivos, um randomizado para o grupo G

e dois para o grupo L, não foram avaliados após terem sido randomizados e foram excluídos do estudo e das análises. O estudo avaliou efetivamente os dados de 66 pacientes. No decorrer do estudo, outros 4 pacientes foram considerados como perdas, em decorrência de não comparecimento aos retornos agendados e ausência de conclusão quanto ao desfecho final. As análises do trabalho foram então desenvolvidas no total de 66 pacientes (INTENÇÃO DE TRATAR - definido no item 3.7.) e para os 62 pacientes com acompanhamento até o desfecho final (ANÁLISE PER PROTOCOLO - definido no item 3.7.), sendo nesta última excluídos aqueles considerados como perdas. O detalhamento da amostra está representado na Figura 3.

Tabela 1 – Dados da leishmaniose tegumentar em Mato Grosso e no ambulatório de leishmanioses do Hospital Universitário Júlio Müller, no período 2004 a 2006.

ANO	2004	2005	2006	Total
Dados MT (SINAN – SES/MT)				
• Notificações de LT**	2868	2868	2751	
Ambulatório HUJM (Dados secundários para os 3 anos)				
Atendimentos/ mês (estimativa)				160-200
Atendimentos/ mês de LT (média)				112
Casos novos* de LC**/ mês (média)				9
Notificações de LT	168	166	139	473
• LC	118	116	97	332
Ambulatório HUJM - Período do estudo (20 meses)				
• Atendimentos de casos de LT (aproximação)				2240
• Atendimentos de casos de LC (aproximação)				1568
• Notificações de casos novos de LT				257
• Notificações de casos novos de LC				178
• Pacientes incluídos no estudo				69

* Casos novos – sem diagnóstico e tratamento prévios.

** LT: leishmaniose tegumentar; LC: leishmaniose cutânea.

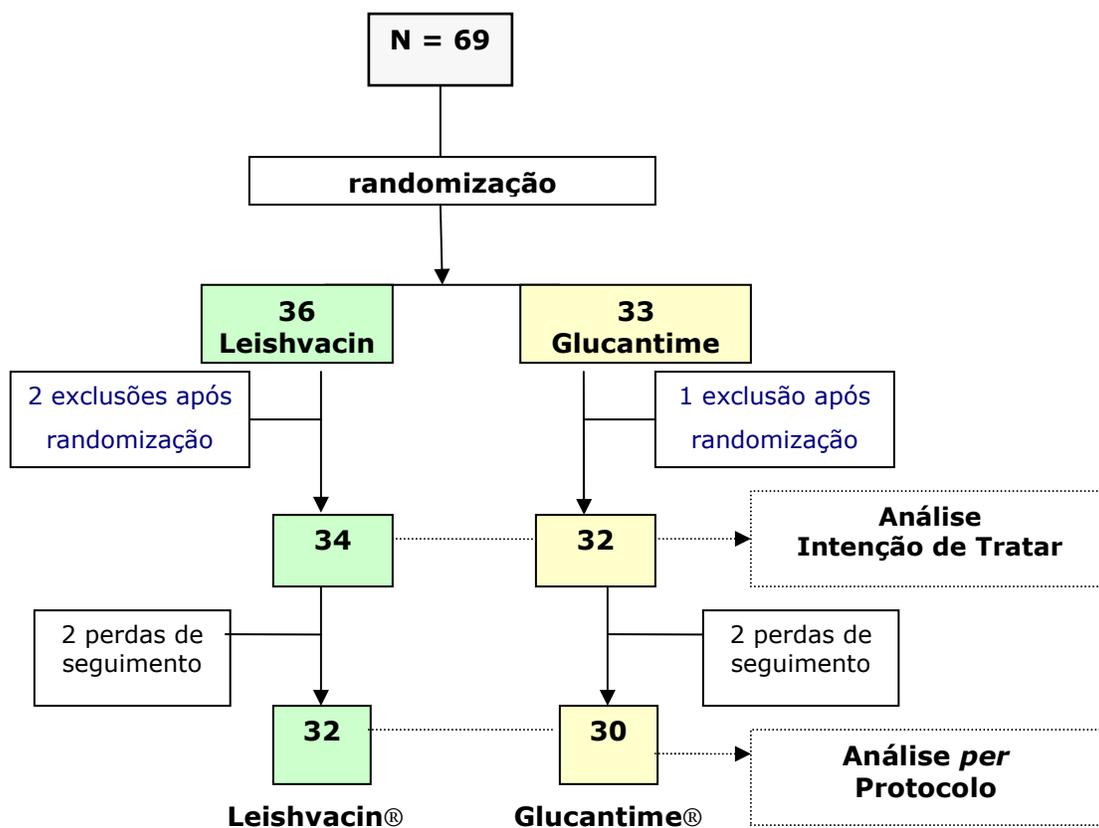


Figura 3. Distribuição dos pacientes do ensaio clínico “Eficácia do Leishvacin® no tratamento da leishmaniose cutânea”.

4.1.1. Características sócio-demográficas

As principais características sócio-demográficas estão demonstradas na Tabela 2. Houve predomínio do sexo masculino, com razão de masculinidade de 12,2. A idade mínima foi de 12 e a máxima de 66 anos (média e mediana de 37 anos); a distribuição por estratos de faixa etária mostra que em ambos os grupos há predomínio de casos nas faixas que vão dos 20 aos 50 anos de idade, com quartis 25 e 75 de 28 e 47 anos, respectivamente. Os pacientes do grupo L tiveram média de idade de 36 anos, mediana de 35 com quartis 25 e

75 de 27 e 46 anos, respectivamente; no grupo G a média de idade foi de 38 anos, com mediana de 39 e quartis 25 e 75 de 28 e 48 anos, respectivamente. A procedência dos pacientes quanto ao local de aquisição da infecção foi preferencialmente Mato Grosso, com distribuição por diferentes áreas do Estado. Sete pacientes (10,6%) vieram de outros Estados, Rondônia, Amazonas e Acre, e em 1 não foi possível determinar o provável município de aquisição da infecção, pois o paciente havia permanecido em localidades diferentes do Estado de Mato Grosso (MT). Os 58 pacientes restantes foram infectados em MT. Considerando-se uma divisão do Estado por mesorregiões, todas demandaram casos, exceto a mesorregião Nordeste (Anexo 5). O anexo relaciona os municípios dos quais procediam os pacientes incluídos no estudo e os coeficientes de detecção de casos de leishmaniose cutânea nos anos de 2004, 2005 e 2006, segundo dados da SES/MT. No anexo mostra-se um mapa de MT com a relação por ordem numérica dos municípios e o global de casos de LT no período do estudo, especificando os coeficientes de detecção para cada município.

Não foram observadas diferenças importantes para as variáveis relacionadas na tabela 2.

Tabela 2. Comparabilidade das características sócio-demográficas de 66 pacientes incluídos no estudo de eficácia de Leishvacin® no tratamento da leishmaniose cutânea. Mato Grosso 2004-2007.

CARACTERÍSTICAS	PRESCRIÇÃO					
	Leishvacin® n= 34		Glucantime® n=32		Total N=66	
	n	%	n	%	N	%
Sexo						
Masculino	32	94,1	29	90,6	61	92,4
Feminino	2	5,9	3	9,4	5	7,6
Razão masculinidade						12,2
Cor da pele¹						
Branco	10	29,4	13	46,6	23	34,9
Pardo	21	61,8	13	40,6	34	51,5
Negro	3	8,8	6	18,8	9	13,6
Idade (anos)						
12 a 19	3	8,8	3	9,4	6	9,1
20 a 35	15	44,1	11	34,4	26	39,4
35 a 50	10	29,4	12	37,5	22	33,3
50 a 66	6	17,7	6	18,7	12	18,2
Local de aquisição da infecção						
Mato Grosso ²	31	91,2	28	87,5	59	89,4
Mesorregião Norte	12/30	40,0	8	28,6	20/58	34,5
Mesorregião Centro-Sul	11/30	36,7	14	50,0	25/58	43,1
Mesorregião Sudeste	4/30	13,3	6	21,4	10/58	17,2
Mesorregião Sudoeste	3/30	10,0	-	-	3/58	5,2
Outros Estados	3	8,8	4	12,5	7	10,6
Atividade relacionada ao risco de infecção						
Trabalho	25	73,5	24	75,0	49	74,2
Lazer	9	26,5	7	21,9	15	22,7
Outra ³	-	-	1	3,1	2	3,1

¹ – Característica atribuída pelo entrevistador.

² – Um paciente do grupo L não soube referir em qual município de MT adquiriu a infecção.

³ – Infecção no local de residência (assentamento rural).

4. 1. 2. Características clínico-laboratoriais

A tabela 3 apresenta as principais características clínicas e laboratoriais da amostra. A úlcera de pele esteve presente em 64 de 66 pacientes (96,7%). Os pacientes se apresentaram com até 2 lesões em aproximadamente 80% dos casos para os dois grupos. A maioria dos pacientes apresentava lesões de até 5 cm em seu maior diâmetro (79,4% para o grupo L e 90,7% para o grupo G). Observou-se predomínio de lesões em membros inferiores para o grupo L e em membros superiores para o grupo G, neste com distribuição mais dispersa em relação à localização de lesões. Para os dois grupos houve predomínio de lesões com até três meses de evolução. A IRM foi positiva em 96,9% dos pacientes do grupo L e em 84,4% daqueles do grupo G, sendo a positividade global de 91,0%. Nos dois grupos, a maioria dos pacientes apresentou exames parasitológicos positivos por 3 ou mais técnicas. Dos pacientes com úlcera, 59,4% apresentaram exsudato em fundo de lesão; não houve associação entre o relato de curativos domiciliares com fármacos e apresentação de lesão ulcerada de fundo limpo na primeira consulta. Onze pacientes (16,7%) apresentaram algum outro tipo de lesão, nove destes (81,8%) também tinham úlceras e 2 (18,2%) somente outras lesões; quatro (36,4%) foram randomizados para o grupo L e 7 (63,6%) randomizados para o grupo G.

Todos os pacientes do estudo tiveram confirmação parasitológica (critério de inclusão). O raspado foi positivo em 100,0% dos exames do grupo L e em 90,6% no grupo G. O desempenho do *imprint* foi semelhante. A frequência de exames positivos pela técnica de aspirado foi inferior (direto e cultura). Dois

pacientes não realizaram exames de cultura; a freqüência de contaminação foi semelhante entre os grupos, sendo de 42,2% para o aspirado e de 29,7% para a cultura de fragmento para o total da amostra (Tabela 4).

Para a caracterização das espécies de *Leishmania* das amostras do estudo, os isolados foram inicialmente encaminhados ao laboratório referência. Em decorrência de dificuldades no transporte e tempo para chegada ao laboratório, várias amostras foram perdidas por contaminação com fungos e bactérias. Após algumas remessas frustradas, optou-se pela manutenção dos procedimentos para as culturas *in vitro*, mas tão somente para isolar o parasito com finalidade diagnóstica. A caracterização de *Leishmania* foi realizada somente por técnica molecular de PCR em fragmento de biópsia.

Pesquisa e caracterização de *Leishmania* em fragmentos de biópsia foram realizadas pelo método de PCR-RFLP em 64 pacientes (Tabela 4). A positividade foi de 59/64 ou 92,2%, sendo todas as amostras, exceto duas, de um único padrão associado ao complexo *L. Viannia*; as outras duas pertencem ao mesmo complexo, mas num padrão diferente de acordo com a digestão por enzimas de restrição, detalhes descritos em Anexo 6.

Tabela 3. Características clínico-laboratoriais dos 66 pacientes incluídos no estudo de eficácia de Leishvacin® na leishmaniose cutânea. Mato Grosso, 2004-2006.

Características	Prescrição					
	Leishvacin® n= 34		Glucantime® n=32		Total N=66	
	n	%	n	%	n	%
Número de lesões						
1	22	64,7	18	56,3	40	60,6
2	7	20,6	8	25,0	15	22,7
3 a 4	4	11,8	4	12,5	8	12,1
5 a 6	1	2,9	2	6,2	3	4,6
Tamanho das lesões (cm)						
≤ 1,0	2	5,9	7	21,9	9	13,6
1,1 - 3,0	17	50,0	19	59,4	36	54,5
3,1 - 5,0	8	23,5	3	9,4	11	16,7
5,1 - 9,0	2	5,9	-	-	2	3,0
>9,0	3	8,8	1	3,1	4	6,1
Não registrado	2	5,9	2	6,2	4	6,1
Localização das lesões						
Cabeça/ Pescoço	3	8,8	8	25,0	11	16,7
Tronco	3	8,8	6	18,8	9	13,6
MMSS	8	23,6	14	45,7	22	33,3
MMII ¹	20	58,8	4	12,5	24	36,4
Tempo de evolução das lesões						
1-3 meses	23	67,7	23	71,9	46	69,7
4-5 meses	11	32,3	9	28,1	20	30,3
Tipo(s) de lesão						
Ulcerada	30	88,2	25	78,1	55	83,3
Não-ulcerada	-	-	2	6,3	2	3,1
Ulcerada e Não-Ulcerada	4	11,8	5	15,6	9	13,6
IRM						
NEGATIVO	1	2,9	4	12,5	5	7,5
5-15 mm	20	58,8	10	31,3	30	45,5
>15 mm	13	38,3	17	53,1	30	45,5
Não realizado	-	-	1	3,1	1	1,5
Pesquisa de parasitos						
Exame direto positivo ²	34	100,0	30	93,8	64	97,0
Cultura positiva ³	23/33	69,7	19/31	61,3	42/64	65,6
PCR positiva ⁴	31/33	93,9	28/31	90,3	59/64	92,2

¹ - p <0,05

² - Qualquer dos exames positivos (raspado, *imprint*, aspirado).

³ - Qualquer das culturas positivas (aspirado e fragmento); 2 pacientes não realizaram culturas, 1 do grupo L e 1 do grupo G.

⁴ - PCR-RFLP em fragmento de biópsia de pele.

Tabela 4. Detalhamento dos resultados dos exames com pesquisa de parasitos, nos 66 pacientes incluídos no estudo de eficácia de Leishvacin® na leishmaniose cutânea. Mato Grosso, 2004-2006.

Prescrição						
Tipo de exame	Leishvacin® (34)		Glucantime® (32)		Total (66)	
	Positivos	%	Positivos	%	Positivos	%
Exame Direto						
Raspado (66)	34	100,0	29	90,6	63	95,5
Aspirado (66)	18	52,9	19	59,4	37	56,1
<i>Imprint</i> (65)	30/34	88,2	24/31	77,4	54/65	83,1
Cultura (64)						
Aspirado ¹	15/33	45,5	11/31	35,5	26/64	40,6
Fragmento ²	22/33	66,7	18/31	58,1	40/64	62,5
PCR-RFLP (64)						
	31/33	93,9	28/31	90,3	59/64	92,2

1 - Culturas contaminadas = 27 (12 no grupo L e 15 no grupo G)

2 - Culturas contaminadas = 19 (8 no grupo L e 11 no grupo G)

4. 2. ANÁLISES DOS DESFECHOS PRINCIPAIS - CURA E FALHA

4. 2. 1. Intenção de tratar

No total de 34 pacientes tratados com o Leishvacin[®] (grupo L), dois pacientes não tiveram seguimento clínico suficiente para se concluir pela cura ou pela falha. Considerando-se o pior resultado possível, ou seja, que ambos tenham evoluído como falha terapêutica, a taxa de cura no grupo L foi de 20,6% (cura em 7 pacientes). Dos 32 pacientes tratados com o Glucantime[®] (grupo G), dois pacientes ficaram sem desfecho constatado por perda do seguimento. Considerando-se o pior resultado possível, ambos evoluindo como falha terapêutica, a taxa de cura no grupo G foi de 81,3% (26 pacientes). Nas análises comparativas entre os grupos, os pacientes tratados com o Leishvacin[®] tiveram 4,25 vezes maior probabilidade de apresentar falha do que os pacientes tratados com o Glucantime[®]. O excesso relativo do risco de falhar no grupo L foi de 325%. A diferença estimada na taxa de cura foi de 60,7% com IC95% de 38,5; 82,9 (Tabela 5).

4. 2. 2. Análise *per* protocolo

Para esta análise, somente foram considerados os pacientes com adesão completa ao seguimento clínico previsto no protocolo e definição dos desfechos clínicos cura e falha, num total de 62 pacientes. A taxa de cura nos 32 pacientes tratados com Leishvacin[®] foi de 21,9% (7 pacientes). A taxa de cura nos 30 pacientes tratados com Glucantime[®] foi de 86,7% (26 pacientes). Um paciente tinha critérios de cura clínica em D50, mas apresentou reativação de

suas lesões em D110, sendo incluído entre os casos de falha. A probabilidade de evoluir com falha foi 5,87 vezes maior no grupo tratado com Leishvacin[®] quando comparado com o grupo controle tratado com Glucantime[®]. O excesso relativo do risco de falhar no grupo L foi de 487%. A diferença estimada na taxa de cura foi de 64,8% com IC95% de 42,8; 86,8 (Tabela 5).

TABELA 5. Resultado da análise da eficácia do Leishvacin[®] comparado ao Glucantime[®] no tratamento da leishmaniose cutânea. Mato Grosso, 2004-2006

GRUPO DE TRATAMENTO	LEISHVACIN[®]	GLUCANTIME[®]
Análise intenção de tratar (n= 66) na hipótese de pior resultado¹		
Pacientes randomizados	34	32
Incidência de cura (%)	7 (20,6)	26 (81,3)
Diferença nas taxas de cura (IC95%)		60,7 (38,5; 82,9)
Incidência de falha (%)	27 (79,4)	6 (18,7)
Risco relativo de cura e IC95%	0,25 (0,13; 0,50)	3,95 (2,00; 7,80)
Risco relativo de falha e IC95%	4,25 (2,02; 8,89)	0,24 (0,11; 0,50)
ERR ³ falha (%)	325%	-
Análise <i>per</i> protocolo² (n= 62)		
Pacientes randomizados	32	30
Incidência de cura (%)	7 (21,9)	26 (86,7)
Diferença nas taxas de cura (IC95%)		64,8 (42,8; 86,8)
Incidência de falha (%)	25 (78,1)	4 (13,3)
Risco relativo de cura e IC95%	0,25 (0,13; 0,49)	3,96 (2,03; 7,74)
Risco relativo de falha e IC95%	5,87 (2,31; 14,86)	0,17 (0,07; 0,43)
ERR ³ falha (%)	487%	

1 – Pacientes sem desfecho constatado (perdas) são considerados falhas (2 para cada grupo).

2 – Pacientes sem desfecho constatado (perdas) são excluídos da análise.

3 – Excesso relativo do risco de falhar

4. 2. 3. Descrição das falhas

Na TABELA 6 estão detalhadas as falhas ocorridas no estudo. De acordo com os parâmetros de resposta terapêutica observados e registrados em D20, D50, D80 e D110, a maioria das falhas associou-se à ocorrência de piora clínica em algum momento do período de observação de 3 meses após o uso da medicação; no grupo L, este tipo de falha correspondeu a 76,0% do total de falhas. A cicatrização incompleta, caracterizada pela melhora sem cicatrização no período de 3 meses, foi menos freqüente, representando 24,0% das falhas do grupo L. Um paciente do grupo G apresentou epitelização completa de sua lesão, mas com reativação antes de D110, sendo considerado falha terapêutica.

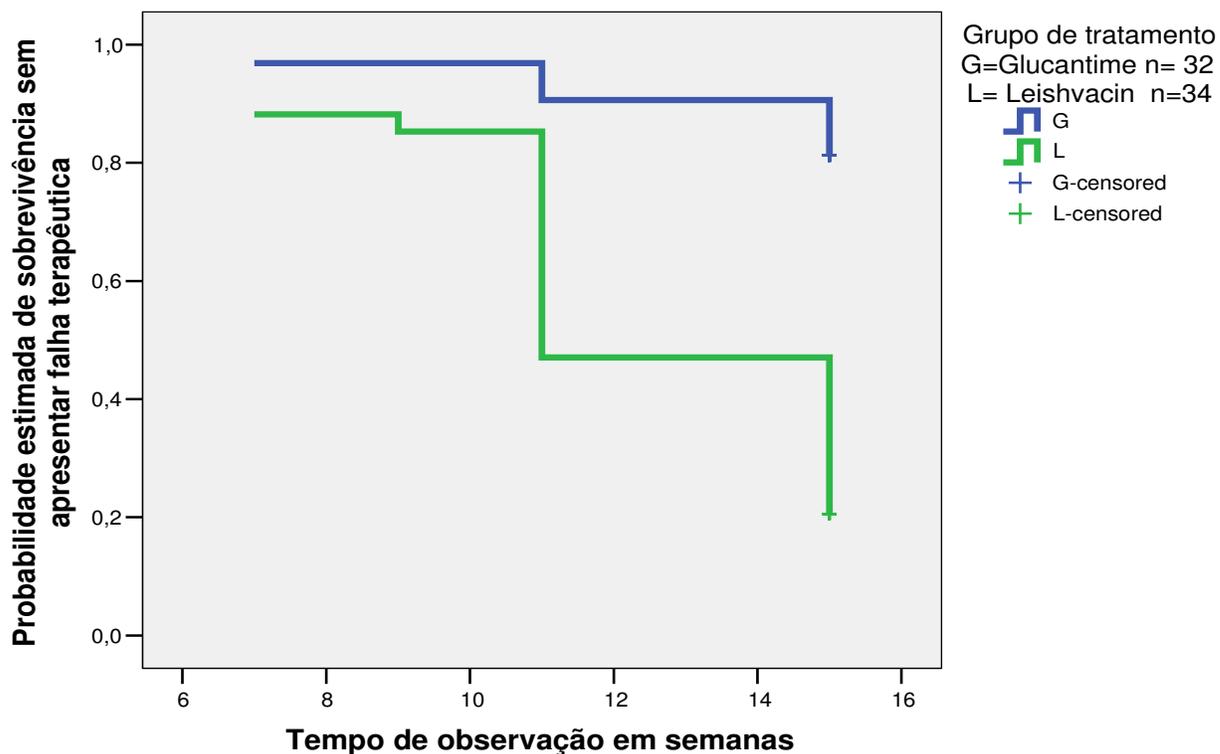
TABELA 6. Detalhamento das falhas terapêuticas ocorridas no estudo da eficácia do Leishvacin[®] considerando-se os 3 meses de seguimento após o uso do medicamento. Mato Grosso, 2004-2006.

Grupo de Tratamento	Leishvacin[®]	Glucantime[®]
Pacientes analisados (62) ¹	32	30
Falhas (%)	25 (78,1)	4 (13,3)
Tipo de falha		
Cicatrização incompleta	6/25 (24,0)	1/4 (25,0)
Piora das lesões	19/25 (76,0)	2/4 (50,0)
Reativação	-	1/4 (25,0)

1 – Excluídos pacientes sem desfecho principal constatado (perdas).

4. 2. 4. Análise de tempo até a falha pelo método de Kaplan-Meier

Os casos de perda foram considerados falha. O tempo de acompanhamento foi registrado em semanas a partir do primeiro dia de tratamento. O tempo médio de sobrevida sem falha foi de 12,3 (11,4; 13,3) semanas para o grupo L e de 14,5 (13,6; 15,1) semanas para o grupo G, num total de 15 semanas de observação e para um total de 79,4% e 18,7% de falhas nos grupos L e G, respectivamente. A diferença nos dois grupos mostrou significância estatística (log rank= 24,31; $p < 0,0001$).



SEMANAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
PACIENTES SEM FALHA															
Leishvacin [®]	34	34	34	34	34	34	30	30	29	29	16	16	16	16	7
Glucantime [®]	32	32	32	32	32	32	31	31	31	31	29	29	29	29	26

Perdas = falhas para fins de análise: Leishvacin[®] = 2 (semana 11); Glucantime[®] = 2 (semana 7 e semana 11).
 Falhas: Leishvacin[®] = 27/34 (79,4%); Glucantime[®] = 6/32 (18,7%).
 RR de falha (IC95%): Leishvacin[®] = 4,25 vezes maior (2,02; 8,89); Log-rank = 24,31 (p< 0,0001).
 Média de tempo em semanas para a falha (IC95): Leishvacin[®] = 12,3 (11,4; 13,3); Glucantime[®] = 14,5 (13,6; 15,1).

Figura 4. Probabilidade estimada de sobrevivência sem apresentar falha no estudo de avaliação de eficácia do Leishvacin[®], por grupo de tratamento e considerando-se 15 semanas de seguimento. Mato Grosso, 2004-2006.

4. 2. 5. Descrição da cura

O desfecho cura está aqui analisado para os 66 pacientes do estudo. Do total de curas do grupo L, 6 ou 85,7% foram assim registradas em D110, momento final do período de observação do estudo. No grupo G, 13 ou 50,0% foram assim registrados até D80 (Tabela 7).

TABELA 7. Detalhamento das curas ocorridas no estudo da eficácia do Leishvacin® considerando-se os 3 meses de seguimento após o uso do medicamento. Mato Grosso, 2004-2006.

Grupo de Tratamento	Leishvacin®	Glucantime®
Pacientes analisados ¹	32	30
Curas (%)	7 (21,9)	26 (86,7)
Tempo para registro da cura e frequência acumulada		
D20	-	1 (3,9)
D50	-	3 (11,5)
D80	1 (14,3)	9 (34,6)
D110	6 (85,7)	13 (50,0)

1 - Na análise de **intenção de tratar** ou **per protocolo** não há alteração do número de pacientes com desfecho cura.

4.3. ANÁLISE EXPLORATÓRIA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS E DESFECHOS CURA E FALHA.

Nesta análise da tabela 8 foram incluídos os pacientes com o desfecho principal definido por seguimento do protocolo, 32 pacientes para o grupo de intervenção (Leishvacin[®]) e 30 pacientes para o grupo controle (Glucantime[®]).

Não houve diferença nas taxas de cura em relação ao sexo, cor da pele, idade, tempo de evolução, tipo e tamanho das lesões, assim como em relação à resposta na IRM, para os dois grupos. No grupo G, houve taxas menores de cicatrização à medida que o número de lesões aumentava ($p = 0,082$), e no grupo L houve incidência menor de cura para as lesões de membros inferiores ($p = 0,06$), mas sem significância estatística em ambas as situações.

Tabela 8. Análise exploratória da associação de características clínico-laboratoriais com a cura clínica, em pacientes do estudo de avaliação da eficácia do Leishvacin® na leishmaniose cutânea. Mato Grosso, 2004-2006.

CARACTERÍSTICAS	Leishvacin® N = 32		Glucantime® N = 30	
	cura (n= 7)	falha (n= 25)	cura (n= 26)	falha (n= 4)
Sexo				
Masculino	7 (23,3)	23 (76,7)	23 (85,2)	4 (14,8)
Feminino	-	2(100,0)	3(100,0)	-
Cor da pele				
Branca	3 (30,0)	7 (70,0)	10 (90,9)	1 (9,1)
Parda	3 (15,8)	16 (84,2)	11 (84,6)	2 (15,4)
Negra	1 (33,3)	2 (66,7)	5 (83,3)	1 (16,7)
Idade				
Média (anos)	33,29	37,48	38,04	38,75
IC95%	17,75;48,82	32,10;42,86	32,94;43,14	16,9;60,58
Tempo de evolução				
Média (meses)	2,71	2,96	3,00	2,25
IC95%	1,14; 4,29	2,41; 3,51	2,54; 3,46	0,25; 4,25
Tipo de lesão				
Ulcerada	5 (17,9)	23 (82,1)	21 (91,3)	2 (8,7)
Não-ulcerada	-	-	1 (50,0)	1 (50,0)
Ambas	2 (50,0)	2 (50,0)	4 (75,0)	1 (25,0)
Número de lesões				
Média ²	1,86	1,48	1,62	2,50
IC95%	0,73; 2,98	1,19; 1,77	1,24;2,00	1,58; 3,42
Tamanho das lesões				
Média	1,84	3,78	2,17	1,63
IC95%	0,89; 2,79	2,44: 5,12	1,22; 3,12	-1,33; 4,60
Local das lesões				
Cabeça/ Pescoço	-	3(100,0)	6 (75,0)	2 (25,0)
Tronco e MMSS	5 (45,5)	6 (54,5)	17 (89,5)	2 (10,5)
MMII ³	2 (11,1)	16 (88,9)	3 (100,0)	-
IRM¹				
Não reator	1(100,0)	-	4(100,0)	-
5-15 mm	3 (15,0)	17 (85,0)	8 (88,9)	1 (11,1)
> 15 mm	3 (27,3)	8 (72,7)	13 (81,2)	3 (18,8)

1 - Grupo G - IRM não realizado em 1 paciente.

2 - p=0,082

3 - p= 0,060

4. 4. RESULTADO DA ANÁLISE MULTIVARIADA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS E DESFECHOS CURA E FALHA.

Número e local da lesão cutânea apresentaram associação com o desfecho terapêutico ao nível de significância igual ou inferior a 0,1 na análise exploratória. Portanto, foram incluídas em um modelo de análise multivariada, além de idade e sexo. Não houve modificação de efeito por essas variáveis. Apenas o medicamento Leishvacin[®] permaneceu associado à falha terapêutica (OR=18,0; IC95%: 4,32-82,58; $p < 0,0001$).

Tabela 9. Resultado da análise multivariada da associação entre características clínicas e falha terapêutica com Leishvacin em pacientes do estudo de avaliação da eficácia do Leishvacin[®] na leishmaniose cutânea. Mato Grosso, 2004-2006.

Características	OR	IC95%	p
Grupo Leishvacin [®]	18,9	4,32; 82,58	<0,0001
Idade	0,98	0,93; 1,03	0,507
Sexo	0,88	0,07; 10,4	0,919
Numero de lesões	0,81	0,38; 1,73	0,577
Local da lesão	1,45	0,36; 5,73	0,600

4. 5. EVENTOS ADVERSOS

4.5.1. Eventos adversos medidos por observação clínica

Os eventos adversos presentes em uma ou mais consultas (D10, D20, e D50), referidos ou questionados, para os diferentes grupos de tratamento, são apresentados com suas respectivas frequências globais nas tabelas 10, 11 e 12.

As avaliações evolutivas das análises laboratoriais são apresentadas nas tabelas 13 e 14.

4.5.1.1 Grupo L ou Leishvacin

Os eventos adversos de maior prevalência neste grupo foram cefaléia e relato de dor à aplicação do medicamento, com frequências parciais de 18,8% para cefaléia e 21,9% para dor em D10; 17,6% em D20 para ambos. Três pacientes relataram artralgia; um deles após receber equivocadamente uma única dose excessiva de 1,0 ml do Leishvacin[®], mantendo a queixa em D20. A mialgia foi relatada também por 3 pacientes, sendo que 1 deles persistiu com a queixa em D50. Nesta mesma frequência foram relatadas febre e fraqueza. Relato de prurido difuso, não relacionado a lesões elementares de pele, ocorreu em 9,4% em D10 e 17,6% em D20. Alteração do apetite (principalmente diminuição) foi relatada por 12,5% em D10 e 2,9% em D20. Eritema no local de aplicação foi observado em 6 pacientes. Os demais eventos adversos estão representados na tabela 10. Poucos eventos adversos referidos em D10 ou D20 estavam presentes em D50.

Tabela 10. Eventos adversos presentes nas consultas de D10, D20, D50, para os pacientes do estudo da eficácia do Leishvacin® na leishmaniose cutânea, grupo Leishvacin® (N=34). Mato Grosso, 2004-2006.

EVENTOS ADVERSOS (ordem da ficha clínica)	LEISHVACIN® (34)					
	D10 (32)		D20 (34)		D50 (30)	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Artralgia	1	3,1	1	2,9	2	6,7
Mialgia	1	3,1	1	2,9	1	3,3
Cefaléia	6	18,8	6	17,6	1	3,3
Febre	1	3,1	1	2,9	1	3,3
Dor à aplicação	7	21,9	6	17,6	-	-
Eritema local	2	6,3	4	11,8	-	-
Prurido	3	9,4	6	17,6	1	3,3
Alteração do sono	4	12,4	4	11,8	-	-
Fraqueza	1	3,1	2	5,9	-	-
Alteração do apetite	4	12,5	1	2,9	1	3,3
Pirose	2	6,3	-	-	-	-
Náuseas	1	3,1	-	-	-	-
Vômitos	1	3,1	-	-	-	-
Plenitude pós-prandial	-	-	1	2,9	-	-
Alteração do peso	1	3,1	3	8,8	-	-
Edema	-	-	-	-	-	-
Tontura	1	3,1	-	-	-	-
Nervosismo	2	6,2	-	-	1	3,3
Flebite	-	-	-	-	-	-
Palpitação	1	3,1	-	-	-	-
Herpes Zoster	-	-	-	-	-	-
Dor abdominal	-	-	1	2,9	-	-

4.5.1.2 Grupo G ou Glucantime

Houve uma maior incidência global de eventos adversos neste grupo. A artralgia foi o efeito mais incidente com freqüências parciais de 56,7% em D10 e D20. Mialgia foi relatada com freqüências parciais de 40,0 e 33,3% em D10 e D20, respectivamente. Cefaléia ocorreu em 40,0% e 33,3% nos dias 10 e 20 da observação, enquanto alteração do apetite ocorreu em 36,7% em D10 e em 33,3% em D20. A ocorrência de febre foi de 26,7% em D10 e 13,3% em D20. Dor à aplicação ocorreu em 6,7% a cada observação de D10 e D20 . Os outros eventos adversos freqüentemente relatados foram fraqueza e alteração do sono, sendo que 7,2% dos pacientes mantinham essa última queixa em D50. A queixa de tontura esteve presente em 26,7% dos pacientes em D10 e em 10,0% em D20. Das queixas relacionadas ao sistema digestivo, a mais freqüente foi a de plenitude pós-prandial, presente em 20,0% em D10 e em 26,7% em D20. Um paciente apresentou-se com quadro de herpes zoster, imediatamente após a conclusão da aplicação do medicamento, evoluindo espontaneamente de forma satisfatória. Os eventos adversos estão representados na tabela 11. Poucos dos eventos adversos referidos em D10 ou D20 se apresentavam em D50, exceto os acima citados.

Tabela 11. Eventos adversos presentes nas consultas de D10, D20, D50, para os pacientes do estudo da eficácia do Leishvacin[®] na leishmaniose cutânea, grupo Glucantime[®] (N=32). Mato Grosso, 2004-2006.

EVENTOS ADVERSOS (ordem da ficha clínica)	Glucantime[®] (32)					
	D10 (30)		D20 (30)		D50 (28)	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Artralgia	17	56,7	17	56,7	-	-
Mialgia	12	40,0	10	33,3	1	3,6
Cefaléia	12	40,0	10	33,3	2	7,1
Febre	8	26,7	4	13,3	-	-
Dor à aplicação	2	6,7	2	6,7		
Eritema local	-	-	-	-	-	-
Prurido	5	16,7	4	13,3	1	3,6
Alteração do sono	10	33,4	9	30,0	2	7,1
Fraqueza	6	20,0	10	33,3	2	7,1
Alteração do apetite	11	36,7	10	33,3	2	7,1
Pirose	4	13,3	3	30,0	-	-
Náuseas	5	16,7	3	10,0	1	3,6
Vômitos	-	-	1	3,3	-	-
Plenitude pós-prandial	6	20,0	8	26,7	2	7,1
Alteração do peso	6	20,0	2	6,7	3	10,7
Edema	2	6,7	-	-	-	-
Tontura	8	26,7	3	10,0	1	3,6
Nervosismo	1	3,3	3	10,0	2	7,1
Flebite	1	3,3	-	-	-	-
Palpitação	2	6,7	1	3,3	-	-
Herpes Zoster	-	-	1	3,3	-	-
Dor abdominal	2	6,7	2	6,7	-	-

4.5.1.3 Análise comparativa dos eventos adversos nos grupos de estudo.

Relata-se a seguir (Tabela 12) as freqüências globais dos eventos adversos apresentados em cada grupo de tratamento, com uma análise comparativa. Há diferenças entre os dois grupos na incidência dos eventos: artralgia, mialgia, febre, eritema no local da aplicação, alteração do sono, fraqueza, alteração do apetite, plenitude pós-prandial e tontura. Todos com maior incidência no grupo G, exceto eritema no local da aplicação.

Tabela 12. Análise comparativa da incidência global de eventos adversos referidos ou questionados, para os pacientes do estudo da eficácia do Leishvacin® na leishmaniose cutânea (N=66). Mato Grosso, 2004-2006.

EVENTOS ADVERSOS (ordem da ficha clínica)	PRESCRIÇÃO				Diferença% (IC95%)	Valor de p
	Leishvacin® (34)		Glucantime® (32)			
	n	(%)	n	(%)		
Artralgia*	3	8,8	22	68,8	60,00 [38,30; 81,70]	< 0,001
Mialgia*	3	8,8	18	56,3	47,50 [24,82; 70,18]	< 0,001
Cefaléia	10	29,4	16	50,0	20,60 [-5,56; 46,76]	0,144
Febre*	3	8,8	10	31,3	22,50 [0,79; 44,21]	0,047
Dor à aplicação	10	29,4	4	12,5	16,90 [-5,26; 39,06]	0,168
Eritema local*	6	17,7	-	-	17,70 [1,84; 33,56]	0,039
Prurido	8	23,5	6	18,8	4,70 [-17,99; 27,39]	0,868
Alteração do sono*	5	14,7	14	43,8	29,10 [5,16; 53,04]	0,019
Fraqueza*	3	8,8	12	37,5	28,70 [6,38; 51,02]	0,013
Alteração do apetite*	5	14,7	16	50,0	35,30 [11,25; 59,35]	0,049
Pirose	2	5,9	6	18,8	12,90 [-5,82; 31,62]	0,220
Náuseas	1	2,9	6	18,8	15,90 [-1,80; 33,60]	0,089
Vômitos	1	2,9	1	3,1	0,20 [-11,07; 11,47]	0,499
Plenitude pós-prandial*	1	2,9	10	31,3	28,40 [8,34; 48,46]	0,006
Alteração do peso	4	11,8	9	28,1	16,30 [-5,71; 38,31]	0,175
Edema	-	-	2	6,3	6,30 [-5,15; 17,75]	0,440
Tontura*	1	2,9	9	28,1	25,20 [5,60; 44,80]	0,012
Nervosismo	2	5,9	5	15,6	9,70 [-8,19; 27,59]	0,379
Flebite	-	-	1	3,1	3,10 [-5,94; 12,14]	0,440
Palpitação	1	2,9	2	6,3	3,40 [-9,77; 16,57]	0,943
Herpes Zoster	-	-	1	3,1	3,10 [-5,94; 12,14]	0,982
Dor abdominal	1	2,9	3	9,4	6,50 [-8,11; 21,11]	0,554

*Eventos adversos com significância na diferença de incidência entre os dois grupos.

4.5. 2. Avaliação evolutiva das análises laboratoriais.

Nesta análise, são avaliados de forma evolutiva os resultados dos exames complementares realizados no acompanhamento dos pacientes. A tabela 13 apresenta esta análise para o grupo L e a tabela 14 para o grupo G. Não são apresentados os resultados de D50.

No grupo L, houve uma redução na contagem de leucócitos e neutrófilos, sem significância estatística.

No grupo G, a análise evolutiva das medidas em D0, D10 e D20, mostrou diferenças nas médias dos resultados de ALT, amilase, hematócrito e leucócitos.

Tabela 13. Avaliação evolutiva das análises laboratoriais, para os pacientes do estudo da eficácia do Leishvacin[®] na leishmaniose cutânea, grupo Leishvacin[®]. Mato Grosso, 2004-2006.

Exames Laboratoriais	Leishvacin [®] (34)			Valor de p
	Média das análises			
	D0	D10	D20	
BIOQUÍMICA				
Creatinina	0,882	0,885	0,874	0,941
ALT ¹ ou TGP	32,38	30,97	29,81	0,846
Fosfatase Alcalina	204,52	182,37	190,14	0,727
Amilase	97,10	99,41	95,04	0,928
HEMOGRAMA				
Hematócrito	45,05	44,51	44,87	0,827
Leucócitos	7950	7560	7193	0,442
• Neutrófilos	4659	4176	3797	0,062
• Eosinófilos	366	381	399	0,421
Plaquetas	233,03	242,59	243,19	0,753

1 – Alanina aminotransferase

Tabela 14. Avaliação evolutiva das análises laboratoriais, para os pacientes do estudo da eficácia do Leishvacin® na leishmaniose cutânea, grupo Glucantime®. Mato Grosso, 2004-2006.

Exames Laboratoriais	Glucantime® (32)			Valor de p
	Média das análises			
	D0	D10	D20	
BIOQUÍMICA				
Creatinina	0.853	0.857	0.887	0,823
ALT ¹ ou TGP	26.27	37.57	42.07	0,020
Fosfatase Alcalina	151.29	163.84	171.12	0,539
Amilase	97.48	130.35	105.00	0,018
HEMOGRAMA				
Hematócrito	44.57	42.59	41.47	0,005
Leucócitos	8378	7038	7383	0,019
• Neutrófilos	4898	4058	4305	0,923
• Eosinófilos	479	460	564	0,304
Plaquetas	252.81	238.73	252.76	0,546

1 – Alanina aminotransferase

5. DISCUSSÃO

5.1. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

A ampla presença da leishmaniose tegumentar (LT) no Brasil, e especialmente em MT, é por si motivação suficiente para a avaliação de novos esquemas terapêuticos. A LT tem alta incidência no Estado, os casos de leishmaniose cutânea (LC), relacionados à infecção recente, estão presentes em locais distantes, onde há dificuldades operacionais para que os pacientes possam ter realizados seu diagnóstico e tratamento. O esquema terapêutico de escolha baseia-se no uso de uma droga de aplicação parenteral por vários dias, não menos do que 20 dias, tornando obrigatório ao paciente o deslocamento de sua moradia para um local de assistência apto a lhe administrar o esquema prescrito e acompanhar os efeitos advindos do tratamento. Frequentemente, este local está a vários quilômetros de distância de sua residência ou ambiente de trabalho, com as dificuldades óbvias que este fato representa. Não há perspectiva próxima à substituição do esquema parenteral por outro igualmente eficaz de uso oral. Uma dificuldade adicional, e possivelmente de maior importância, é a toxicidade potencial dos antimoniais, com limitações a seu uso, com necessidade de acompanhamento dos pacientes com exames clínicos e complementares, prática nem sempre possível nos locais de tratamento desses doentes. Assim, as iniciativas para o conhecimento do comportamento da resposta à terapêutica em indivíduos com LT deveriam ser estimuladas. A procura por novos produtos ou esquemas diferentes com

produtos conhecidos, pode não encontrar de imediato um esquema que substitua o atual, mas pode acrescentar no conhecimento e desenvolvimento futuro de drogas mais próximas do ideal, e também auxiliar na ampliação de um arsenal terapêutico hoje tão pobre, mesmo que para condições particularizadas em que o tratamento padrão não se aplica.

Como abordado na *Introdução*, resultados anteriores com o Leishvacin[®] mostraram ser esta uma vacina de uso potencial para o tratamento das leishmanioses, o que estimulou a elaboração do projeto que daria origem a este estudo. A vacina havia sido descrita como de potencial terapêutico, até semelhante ao convencional segundo os resultados publicados, e com baixa frequência de eventos adversos associados. Mas, os esquemas avaliados apresentavam o inconveniente da longa duração com repetições de várias séries de aplicações. Assim, se optou por avaliar o efeito terapêutico, mas num esquema considerado factível para aplicação rotineira.

Também o fato de o Leishvacin estar registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como imunoprolático e também como imunoterápico para a LT, sem ser de fato considerado uma opção terapêutica nos manuais que orientam os esquemas de tratamento da LT (BRASIL, 2006; BRASIL, 2007), indicava a necessidade de avaliação.

5.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE O PLANEJAMENTO DO ESTUDO: AMOSTRAGEM, CONTROLE E MASCARAMENTO.

A opção pelo ensaio clínico pressupõe a observância de um planejamento de estudo baseado em conceitos metodológicos bem definidos. Os principais são: o cálculo de uma amostra adequada a expressar as diferenças eventuais existentes no desfecho a ser obtido com os dois diferentes esquemas terapêuticos propostos; a decisão sobre necessidade e adequação do mascaramento; a decisão sobre o grupo controle, se constituído de pacientes em uso do tratamento convencional (controles ativos) ou em uso de placebo (POCOCK, 1987; FLETCHER & FLETCHER, 2006). As condições que nortearam estas decisões são relatadas a seguir.

Cálculo amostral

O cálculo da amostra considerou o conhecimento prévio da eficácia daquele medicamento que viria a se constituir o controle ativo, um antimonial pentavalente, o antimoniato de meglumina, disponível no Brasil com o nome de marca Glucantime[®]. Porém, há mais dados publicados de revisão sobre a eficácia alcançada com o antimonial pentavalente em séries de pacientes estudados do que propriamente estudos terapêuticos de modelos validados para a avaliação de eficácia. Há fatores diversos que podem interferir nas conclusões advindas destas publicações. A espécie de *Leishmania* pode ser fator fundamental para o sucesso ou o fracasso de um esquema terapêutico nas leishmanioses e, especialmente, na leishmaniose cutânea (LC) em que

diferentes e distantes espécies de *Leishmania* podem se relacionar a quadros clínicos semelhantes entre si. Daí a necessidade de ao menos se conhecer a distribuição de espécies por regiões ou localidades geográficas, a fim de se proceder a um julgamento sobre determinados resultados, quando não estão disponíveis informações sobre a caracterização das espécies de *Leishmania* dos pacientes tratados num determinado estudo. O valor atribuído à eficácia esperada, então, foi resultado de uma interpretação dos trabalhos de revisão publicados na literatura (BERMAN, 1988; ARANA *et al.*, 1994; BERMAN, 1996; BERMAN, 1997; SALDANHA *et al.*, 1999; DEPS *et al.*, 2000), não se levando em conta a experiência local acumulada ao longo de 10 anos de serviço de atendimento às leishmanioses, apesar de se considerar possibilidade de valores mais elevados de eficácia (80%) do que o considerado para estudo (60%).

O segundo momento do cálculo amostral, quando da estimativa de quanto o esquema experimental se afastaria da hipótese de nulidade com relação à eficácia, também se apresentou com dificuldades, visto que os estudos anteriores sobre o uso do Leishvacin[®] para tratamento de leishmanioses foram construídos com métodos diversos, principalmente quanto aos esquemas terapêuticos e acompanhamento dos pacientes. Em alguns, os esquemas relatados eram realizados na forma de imunoquimioterapia, isto é, associando-se o Leishvacin[®] ao antimonial pentavalente, e em outros, avaliou-se esquemas de imunoterapia, sempre muito prolongados e com número final de aplicações muito variável (MICHALIK *et al.*, 1987; MAYRINK *et al.*, 1992; GENARO *et al.*, 1996; MACHADO-PINTO *et al.*, 2002). Como nos estudos anteriores, a

eficácia relatada variou entre 40 e 100 por cento, foi atribuída uma diferença estimada de 20% deste para o grupo controle, assim considerando que a eficácia do Leishvacin[®] poderia variar entre 40 e 80 por cento e seria detectada por esta amostra, inicialmente calculada em 200 pacientes, 100 para cada grupo.

Escolha do grupo controle e opção pelo estudo aberto

A importância de um grupo controle é inquestionável no desenho de um ensaio clínico. Um outro grupo de pacientes, além daquele da intervenção, que disponha da mesma condição de atenção, reduz a importância da presença de fatores intervenientes no resultado final em avaliação. O questionamento que se impôs no planejamento foi sobre qual grupo controle seria adequado. A utilização de um placebo não foi considerada aceitável, por razões como a situação de risco de estigmatização estética que envolve o curso da LC, e, o potencial desenvolvimento de formas clínicas de maior gravidade como a leishmaniose mucosa (LM). Esta é uma condição clínica considerada evolutiva da LC, sobre a qual há lacunas no conhecimento da etiopatogênese. A ausência de tratamento medicamentoso da LC ou demora na cicatrização das lesões primárias cutâneas são consideradas fatores de risco para seu desenvolvimento. Outra opção considerada foi o de uso de um placebo em conjunto tanto com a droga de intervenção como a de uso convencional, e nesse caso seriam necessárias duas aplicações diárias dos dois medicamentos, um por via subcutânea e outro por via intravenosa, por um período de 20 dias. Considerou-se que a natureza objetiva da avaliação do estudo, definição de

cura por epitelização das lesões, não justificaria a adição do placebo, com as inconveniências descritas. Assim, considerou-se não haver justificativa ética também para esta opção. O estudo foi, então, conduzido de modo aberto, com controles ativos e não houve prejuízo na avaliação dos desfechos. Um dado que soma a favor desta conclusão é que 96,9 por cento dos pacientes do estudo apresentavam úlceras como lesões, cujo desfecho cura é de fácil interpretação.

Interrupção do estudo

O planejamento inicial do estudo foi modificado após a realização de uma análise intermediária, não planejada anteriormente, mas necessária em decorrência da observação de frequência elevada de indicações de retratamento nos pacientes do estudo. A própria pesquisadora pôde proceder a análise, já que o estudo foi realizado de forma aberta. Com aproximadamente 70 por cento do que se tem hoje como total da amostra, a taxa de cura no grupo experimental era de 9,09% (IC95% 1,59; 30,62) e a taxa de falha superior a 90 por cento, tanto na análise por intenção de tratar como per protocolo (90,91% e IC95% de 69,38; 98,41). No grupo controle, havia uma única falha constatada, em proporção semelhante de pacientes incluídos, visto que a randomização por blocos manteve a distribuição homogênea entre os grupos em todo o período do estudo. A conclusão foi de que os desfechos principais cura e falha estavam determinados, a eficácia terapêutica estimada para o tratamento experimental não seria alcançada, mesmo considerando-se

a pior perspectiva de 40%. Também a superioridade do grupo controle estava determinada. Assim, o estudo foi interrompido.

Uma outra condição contribuiu para essa decisão. Com o lento recrutamento no estudo, os desfechos foram observados numa fase em que havia número reduzido de participantes. O serviço para atendimento de leishmanioses do Hospital Universitário Júlio Müller (HUJM) da UFMT, no qual os pacientes foram selecionados e acompanhados, teve início há mais de 10 anos e é uma referência no estado de Mato Grosso. A atuação se dá não somente na assistência aos pacientes a ele encaminhados, mas também servindo como campo de estágio e treinamento de acadêmicos, médicos residentes e profissionais da área de saúde em geral. Por demanda do Estado, são realizados treinamentos periódicos sobre a assistência às leishmanioses, dirigidos aos médicos e enfermeiros do Programa de Saúde da Família de todo o interior de Mato Grosso. É provável que este esforço conjunto tenha melhorado as condições locais de assistência aos pacientes, de forma que uma primeira dificuldade foi a presença reduzida de casos de LC que atendessem ao critério primeiro para inclusão no projeto, ou seja, o não tratamento prévio com medicamentos específicos. Conforme detalhado, houve uma desproporção entre a demanda geral do serviço e a freqüência dos casos novos de LC. Somente 11 por cento dos casos de LC cumpriam tais critérios, reduzindo-se o universo amostral a um número menor do que os 200 casos no período planejado do estudo. Ainda assim, nem todos esses casos preenchem um outro critério de inclusão. Por condições inerentes ao processo de transmissão e doença da LC, a maioria destes pacientes vem de municípios distantes e

mesmo quando concordam em permanecer em Cuiabá, necessitam retornar após a conclusão do período de aplicação dos medicamentos. Assim, a principal condição de não preenchimento de critérios, depois de relato de tratamento prévio, foi a não disponibilidade para retornos dentro do período de 110 dias que totalizava o estudo.

5.3 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

A distribuição das características sócio-demográficas e clínicas foi semelhante entre os dois grupos do estudo. Optou-se pela não realização de análise estatística nesta fase, porque eventuais diferenças podem ocorrer ao acaso e a ausência de diferenças não assegura a homogeneidade entre os grupos (ALTMAN & DORÉ, 1990; SCHULZ & GRIMES, 2002). O processo de randomização está diretamente relacionado à confiabilidade de distribuição homogênea de características dependentes entre grupos. Mas, há prejuízo desse pressuposto em amostras pequenas como a do estudo apresentado.

Um total de 61 de 66 pacientes era do sexo masculino. Esses resultados são coerentes com a observação de que a transmissão da doença em Mato Grosso está ainda associada a um padrão de transmissão relacionado à penetração do homem nas matas nativas, onde a doença ocorre na forma de enzootia. Os padrões epidemiológicos silvestre e ocupacional (BRASIL, 2007) são os que se adequam aos casos de LT em MT. A presença maior de homens jovens reforça esta condição. As atividades laborais mais frequentemente relatadas pelos pacientes foram desmatamento e lavoura, tanto como

empregados em fazendas e sítios como na condição de proprietários de pequenos lotes advindos de assentamentos tão comuns na região. Dados semelhantes foram relatados em trabalhos anteriores (HUEB *et al.*, 1995; 1997c). Estes aspectos da transmissão são considerados clássicos na LT e outros autores, trabalhando em áreas onde o padrão de transmissão era associado à penetração em áreas florestais, observaram aspectos semelhantes de distribuição de LT por sexo e faixa etária em suas casuísticas (PESSOA, 1941; DOURADO *et al.*, 1989; BASANO E CAMARGO, 2006).

A distribuição de casos de LT em MT não se faz de forma homogênea por serem diferentes os fatores locais associados ao estabelecimento do ciclo de transmissão da doença, mas pode-se considerar que MT apresenta sempre incidência elevada, em números absolutos ou relativos. O Brasil apresentou nos últimos 20 anos uma média anual de 28.568 casos e coeficiente de detecção médio de 18,5 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2007); em 2005, o total de casos no estado foi de 2868, ou seja, 10% da média total anual brasileira, sendo que a população mato-grossense representa aproximadamente 1,5% da população brasileira.

No estado, há maior incidência de casos na mesorregião Norte, explicada pela ocupação relativamente recente da região, com a maioria dos assentamentos e projetos de desenvolvimento não ultrapassando duas décadas; 12 dos 27 municípios com procedência de casos estavam nesta região, representando 34,5% dos casos, percentual elevado considerando-se a distância destes municípios em relação à capital, o mais próximo, Nobres, a 150 km, mas com municípios tão distantes como Juruena a 893 km (486,17

km foi a média de distância dos municípios da região Norte com procedência de casos) (detalhado em **ANEXO 5**). Os casos da mesorregião centro-sul representaram 43,1% do total, provavelmente pelo fato do local do estudo estar aí situado. Mas, este dado pode sugerir uma outra interpretação. Há 10 anos, quando da conclusão de um trabalho de caracterização de aspectos da epidemiologia, clínica e diagnóstico da LT em MT, também realizado com uma amostra de conveniência atendida neste mesmo serviço, os casos do norte de MT representavam 70% do total do estado e foram 50% da amostra do estudo (HUEB, 1997c). Menos do que uma provável redução de casos nesta região, há talvez um aumento na frequência de casos em áreas de transmissão até há pouco silenciosas na região centro-sul, onde estão as cidades e propriedades rurais mais antigas e portanto já exploradas. Não há dados oficiais e um estudo localizado não responde a essas questões, mas por relatos esporádicos de pacientes hoje doentes, residentes em áreas sem casos há várias décadas, é provável que alguma mudança ambiental recente e extensa esteja ocorrendo, pois são distantes entre si esses locais de expressão recente. É mais provável que se relacione com a construção de usinas hidrelétricas, como a recém inaugurada Usina do Manso, distante menos de 100 km da capital e sobre a qual há discussões e projetos dirigidos à chamada área de influência do Manso. As regiões Sudeste e Sudoeste contribuíram com 17,2% e 5,2%, respectivamente. Não houve casos da região Nordeste, porém, investigando-se os casos da região no Estado, observa-se a presença de municípios de alta incidência de casos, como Alto Boa Vista, Cocalinho ou Cana Brava do Norte (**ANEXO 5**), entre outros. A não procura pelo serviço seja talvez explicada pela

proximidade com Rondonópolis, a maior cidade pólo depois da capital, e também pela proximidade com o Estado de Goiás, com provável busca de assistência no Estado vizinho.

A úlcera de pele esteve presente em 96,9% dos pacientes; na totalidade dos pacientes do grupo L e em 93,7% dos pacientes do grupo G. A frequência encontrada foi maior do que a geralmente relatada em séries apresentadas. Mesmo em estudo anterior no mesmo serviço, a frequência foi um pouco inferior, 89,7% em 134 pacientes com confirmação parasitológica do diagnóstico (HUEB, 1997c). Os aspectos clínicos característicos da leishmaniose tegumentar (LT) têm sido descritos em trabalhos clássicos da literatura médica. Com relação às lesões das formas cutâneas de leishmaniose, PESSÔA & BARRETO (1948) referiam: "Em geral, não apresenta o diagnóstico da leishmaniose cutânea maiores dificuldades quando as lesões revestem o aspecto ulceroso típico - ... nódulo que logo se rompe, determinando a formação da úlcera leishmaniótica, com superfície granulosa e bordas nítidas, indolor; muitas vezes basta um exame objetivo para se estabelecer a sua natureza. Quando, porém, elas assumem formas mais raras, tais como as verrucosas, framboesóides, linfangítica, etc., podem, então ser confundidas com outras entidades nosológicas, tornando-se difícil firmar-se o diagnóstico, a não ser pelos métodos laboratoriais." A experiência em áreas endêmicas como a de Três Braços, BA, confirma este aspecto clássico das formas cutâneas. Relatos da casuística desta localidade mostram presença de úlceras em 87% dos pacientes com formas cutâneas (LLANOS-CUENTAS *et al.*, 1984a; LLANOS-CUENTAS *et al.*, 1984b). Em casuística do Hospital Evandro Chagas da

FIOCRUZ, no Rio de Janeiro, encontrou-se 80,3% de úlceras em 213 pacientes com LC (MATTOS, 1993) e em trabalho mais recente, o mesmo grupo relatou a presença de úlceras em 95,3% dos pacientes que tiveram acompanhamento no serviço num período de 11 anos, dados de uma avaliação retrospectiva (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2000).

Os resultados em relação a outras características das lesões cutâneas, número, tamanho, localização, tempo de evolução, concordam com outros relatos da literatura. As lesões são únicas na maioria dos pacientes de LC, principalmente naqueles procedentes de áreas de predomínio de *L. (V.) braziliensis* (ROMERO, 2000; OLIVEIRA-NETO, 2000). O tamanho das lesões pode variar na dependência de fatores como infecção secundária ou tempo de evolução, e até dependendo da espécie, provavelmente sendo as úlceras por *L. (V.) braziliensis* mais extensas se comparadas com as úlceras por *L. (V.) guyanensis* (ROMERO, 2000). As lesões cutâneas de leishmaniose são sempre mais freqüentes em áreas expostas, pela relação da picada do inseto vetor e a lesão primária de pele. A lesão ulcerada de extremidades inferiores pode ter tempo aumentado para cicatrização, independente de associação com infecção bacteriana secundária (LÚJAN, 2000), mas esta aparente influência negativa pode significar apenas tempo maior para a epitelização, sem interferir no desfecho final da cura que pode estar positivamente associado com lesões em membros inferiores (Romero, 2000). No grupo L houve um predomínio da localização em membros inferiores, enquanto no grupo G predominaram lesões nas extremidades superiores; numa análise exploratória, houve diferença dentro do grupo L na taxa de cura em relação ao local das lesões, porém a

diferença não se confirmou quando realizada a análise multivariada, permanecendo o uso do Leishvacin como único fator associado à falha. As lesões dos pacientes do estudo tinham evolução recente, menor do que 3 meses para aproximadamente 70% dos casos em ambos os grupos, mas este pode ser um resultado enviesado, pois tempo até 6 meses foi um dos critérios utilizados para inclusão, apesar de 5 meses ter sido o máximo de tempo relatado de evolução de lesões.

A IRM foi positiva em 92,5% dos pacientes, mostrando bom desempenho e correlação com as técnicas parasitológicas. A positividade desta técnica diagnóstica pode variar de acordo com forma clínica (mais positiva nos pacientes com lesão mucosa), tempo de doença, etiologia e condições individuais que podem interferir com a resposta imunológica frente à infecções. Por se tratar de uma reação dependente da resposta imune celular tardia, as doenças que cursam com este tipo de imunodepressão como a aids podem falsear resultados. Numa amostra homogênea como a de um ensaio clínico, em que critérios pré-estabelecidos para a inclusão de pacientes reduzem a probabilidade dessas situações intervenientes, espera-se positividade com valores mínimos de 80%. Montenegro em 1926, ao descrever seus primeiros resultados com esta técnica encontrou 86,4% de positividade, mas a amostra de indivíduos era heterogênea principalmente quanto ao tempo de evolução, e o composto antigênico utilizado diferia do atual. Mais tarde, após a padronização da técnica (MELO *et al.*, 1977), outros trabalhos foram publicados, consagrando esta como uma técnica de boa sensibilidade, auxiliar no diagnóstico da LT desde que bem interpretada. A presença da reação positiva pode significar

infecção ocorrida num passado recente ou remoto, com ou sem doença manifesta, e mesmo contato com vetor infectado, sem necessariamente significar infecção. Neste estudo, todos os pacientes tiveram confirmação parasitológica e, portanto, os exames positivos correspondem à situações de infecção com doença ativa. Em trabalho anterior, no mesmo serviço, a positividade para pacientes com LC confirmada foi de 75,5% (HUEB, 1997c), abaixo do habitualmente relatado e do resultado ora apresentado.

Todos os pacientes tiveram confirmação parasitológica (critério de inclusão). Os exames diretos, esfregaços de raspado ou aspirado ou impressão de fragmento de biópsia (*imprint*), tiveram bom desempenho, especialmente o raspado com 100% de positividade no grupo L. Freqüência elevada e inesperada de contaminação comprometeu os resultados dos isolados em cultura, método normalmente com desempenho superior aos exames diretos. Nas fases iniciais do estudo, tubos semeados eram encaminhados ao Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses – IOC – FIOCRUZ – RJ, para que se procedesse a caracterização da espécie, mas o envio foi interrompido em decorrência da freqüente contaminação das amostras e dificuldades operacionais no transporte. A dificuldade no transporte foi minimizada pela identificação e caracterização de amostras de *Leishmania* a nível de complexo, a partir de espécimes de biópsias das lesões de pele dos pacientes, utilizando-se uma técnica molecular, o método de PCR-RFLP. Foi possível diferenciar todas as amostras positivas como sendo do complexo *L. Viannia*, mas não se podendo afirmar pela técnica desenvolvida até então se todas as 62 positivas pertencem a uma única espécie. Por digestão enzimática, constatou-se que 60

ou 96,8% tinham o mesmo padrão P2/P1 (**ANEXO 6**), provavelmente pertencendo à mesma espécie. Como dado adicional, os dois pacientes dos espécimes com padrão diferente P1/P2 apresentaram aspectos que podem se relacionar a esta diferença; um deles é o único paciente com procedência do Estado do Amazonas e o outro, procedente do norte de MT, foi um paciente que apresentou cicatrização precoce, mas com reativação dentro do período de acompanhamento do estudo, único em sua evolução. É conhecida a maior diversidade de cepas presentes na Amazônia, onde a *L. (V.) guyanensis* pode ser a espécie predominante em certas localidades, com presença também de *L. (L.) amazonensis* e de outras de ocorrência mais rara no homem (LAINSON *et al.*, 1994; ROMERO, 2000; ROMERO *et al.*, 2001; SILVEIRA *et al.*, 2002). Em trabalhos publicados recentemente sobre as espécies prevalentes em MT, leishmânias do complexo *L. mexicana* representaram 5,9% e do complexo *L. braziliensis* 94,1% de 68 amostras coletadas no serviço onde o estudo atual foi realizado (ANDRADE *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2006). Inicialmente as amostras foram submetidas a uma primeira análise por PCR e hibridização do DNA, que identificou até nível de complexo, com concordância de 100% entre as técnicas. Num segundo momento, uma amostra aleatória deste total foi submetida à caracterização por eletroforese enzimática, 33 ou 51,7% das amostras pertencentes ao complexo *L. braziliensis* e 3 ou 75,0% das amostras do complexo *L. mexicana*, sendo confirmadas como *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, respectivamente. Tanto o trabalho aqui apresentado como os já publicados, foram realizados com amostras de conveniência de um serviço de referência, tendo limitações para concluir sobre a real distribuição das espécies

de *Leishmania* nos diferentes biomas do Estado e a distribuição natural da enzootia. Mas, considerando-se a procedência diversificada dos pacientes, os dados atuais que mostram incidência aproximada de 100 por cento de *Leishmania (Viannia) braziliensis* no estudo, apontam para a conclusão de que esta é a espécie dominante em MT.

5.4 ANÁLISE DOS DESFECHOS PRINCIPAIS – CURA E FALHA

Na análise de intenção de tratar, foram avaliados os dados sobre desfecho clínico principal de todos os pacientes acompanhados, independente se com desfecho constatado ou não, incluindo então as perdas que passam a ser classificadas como falhas. Apesar da propriedade metodológica deste conceito, ou seja, se não há constatação da cura, deve ser considerado falha, pode-se ter como hipótese que pacientes tratados com uma série de medicamentos e que deixam de comparecer aos retornos agendados, mais provavelmente tiveram cicatrização de suas lesões, achando desnecessário o comparecimento. Essa hipótese se aplica a uma doença como a leishmaniose que necessita de um tratamento especializado, alcançável somente em serviços específicos. Numa outra doença, o paciente poderia não retornar por qualquer nível de insatisfação, indo se tratar em outro serviço. De qualquer forma, considerou-se perda como falha num raciocínio de “pior resultado”.

Foi também realizada uma análise *per* protocolo, em que as quatro perdas estão excluídas. Os resultados daí obtidos poderiam ser considerados mais

próximos do real para as condições do ensaio, considerando-se estritamente a validade interna do estudo.

Ainda foi realizada uma análise de tempo até a falha, por curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. Os resultados expressam a probabilidade de se permanecer sem falha terapêutica dentro do período de seguimento do estudo. Permite a comparação dos resultados obtidos para os dois grupos.

Em todas as análises fica evidente que a frequência de falhas por Leishvacin[®] é superior àquela atribuída ao Glucantime[®] e que esta diferença alcança significância estatística.

A incidência de cura no grupo L variou de 20,1% a 21,9% segundo o tipo de análise, enquanto no grupo G variou de 81,3% a 86,7%. Por qualquer análise a probabilidade de curar utilizando o Glucantime[®] foi aproximadamente 4 vezes maior, enquanto o uso do Leishvacin[®] aumentou o risco de falhar em 325% a 487%.

Os resultados obtidos com o Glucantime[®] estão de acordo com o relatado na literatura e coincide com a experiência local (MARSDEN, 1985; HERWALDT, 1988; BERMAN, 1996; HUEB, 1997c; SALDANHA *et al.*, 1999; ROMERO *et al.*, 2001). Mas os resultados obtidos com o imunoterápico Leishvacin[®] discordam do já publicado sobre as experiências do grupo de pesquisadores responsável pela totalidade das publicações.

A resposta terapêutica na leishmaniose está condicionada a fatores como espécie de *Leishmania* responsável pela doença, resposta individual à infecção e condições basais imunológicas do paciente. Outras condições que interferem na resposta a qualquer tratamento para qualquer doença, como a melhora

clínica pela simples participação num protocolo de pesquisa, são minimizadas num ensaio clínico como o aqui apresentado, porque os grupos de tratamento recebem os mesmos cuidados adicionais ao tratamento específico, sofrem as mesmas intervenções, recebem tratamento supervisionado e têm o mesmo período de acompanhamento. Há fatores que podem ser considerados intervenientes e difíceis de mensurar como o risco de cicatrização espontânea que é sempre uma condição a ser considerada quando do tratamento principalmente da forma cutânea (CARVALHO *et al.*, 1995; LEE & HASBUN, 2003; MORIZOT *et al.*, 2007). Os estudos anteriores utilizando o Leishvacin[®] como um imunoterápico utilizaram esquemas de grande heterogeneidade quanto à dose total final e tempo para execução dos esquemas, por exemplo num dos primeiros relatos alguns pacientes foram tratados por períodos tão prolongados quanto 20 meses (MICHALIK *et al.*, 1987; GENARO, 1996). A incidência da cicatrização espontânea em condições de campo não é sequer estimada na nossa realidade, pois estudos com placebo são eticamente questionáveis diante da constatação da extensa presença da *Leishmania (Viannia) braziliensis* no país, nas mais diversas situações epidemiológicas, e considerando ser esta a espécie associada ao desenvolvimento de formas mucosas tardias. Assim, estudos baseados em protocolos de tratamento e acompanhamento prolongados podem ter questionados seus resultados, visto a probabilidade não controlável de ocorrência de cura clínica por cicatrização espontânea. É provável que a diferença encontrada comparando-se o resultado atual com os resultados já publicados seja ao menos em parte atribuível a este fator.

As falhas ocorreram principalmente por piora das lesões no período de acompanhamento após a fase de uso dos medicamentos. O período de observação pós-tratamento neste trabalho coincide com o recomendado dentro do esquema preconizado pelo MS, que tem como pressuposto o argumento que a maioria dos pacientes com sensibilidade a um esquema terapêutico teria suas lesões cicatrizadas dentro deste período. Numa minoria de casos, independente do grupo de tratamento, a indicação do retratamento foi a cicatrização incompleta no período, o que pressupõe uma resposta terapêutica parcial, pois houve melhora das lesões mas não o suficiente. Para a maioria que teve a indicação do retratamento por piora das lesões, o pressuposto plausível seria de resistência total ou primária às drogas utilizadas. Como citado nos resultados deste trabalho, o paciente com reativação tinha um padrão diferenciado quando da caracterização de *Leishmania* por PCR, e talvez a variação aparentemente intra-específica ou dentro do complexo, guarde alguma relação com este comportamento clínico. O material dos dois pacientes com esta diferenciação, e também dos 5 pacientes que tiveram exames negativos por esse método, serão novamente analisados na tentativa de se completar esta avaliação.

A curva de sobrevida nesse contexto de um excesso de falhas no grupo de intervenção foi analisada quanto à probabilidade de cada paciente em acompanhamento permanecer sob o *risco de curar*, ou seja, ao fim do período quantos ainda se mantinham nessa condição. Há uma diferença evidente no resultado das curvas do grupo L e do grupo G, somente confirmando por outra análise o resultado quanto aos desfechos clínicos principais. Mas esta análise

mostra também que há diferença entre os grupos quanto ao tempo decorrido até a falha, sendo esse tempo menor no grupo L. Esse dado é consistente com o comentado sobre ser a piora da lesão a principal indicação de retratamento nesse grupo (75%), pois naqueles com indicação por ausência de cicatrização, o retratamento foi iniciado após se completar o período de observação.

Num breve detalhamento sobre o desfecho de cura, observa-se que metade das curas do grupo G foram assim registradas até o término do segundo mês de seguimento pós-tratamento, um mês antes de se completar o período total. Se por um lado esse dado é uma constatação da boa resposta terapêutica no grupo, por outro lado mostra que a outra metade dos casos necessitou dos três meses completos de seguimento para a constatação da cura, reforçando as atuais recomendações do MS sobre o período adequado de seguimento.

Em outra análise avaliaram-se possíveis associações entre características clínicas e resposta terapêutica. Numa análise exploratória inicial os resultados apontaram possíveis diferenças nas taxas de cura em relação ao local e número de lesões. Indicavam a possibilidade de um pior prognóstico para lesões de membros inferiores nos pacientes do grupo L e para lesões em maior número nos pacientes do grupo G. Outros trabalhos (ROMERO, 2000) mostraram uma associação negativa entre lesões de extremidades inferiores e cura, maior em relação ao tempo necessário para ocorrer cicatrização, talvez por condições circulatórias não favoráveis desse segmento quando comparado a outras partes do organismo, mas também pela eventual frequência maior de infecções bacterianas que atuariam como uma co-morbidade. Um dos poucos

estudos que avaliou essa hipotética associação entre infecção bacteriana em úlceras de membros inferiores por LC e demora na cicatrização não confirmou essa relação (LÚJAN, 2000). Essa localização ocorreu com maior frequência no grupo L, o que apresentou maior frequência de falhas, indicando a necessidade de se avaliar a independência desse efeito do tratamento em relação a outras variáveis. Já com relação ao número de lesões, a média foi maior para os pacientes do grupo G com resultado de falha. Quando realizada a análise multivariada, não se confirmou o efeito dessas características clínicas sobre o efeito do tratamento, apenas permanecendo o uso do Leishvacin[®] como fator associado à falha.

5.5. ANÁLISE DOS EVENTOS ADVERSOS

O tratamento com antimonial pentavalentes está relacionado a uma série de efeitos adversos. Os de maior frequência são aqueles que não expõem os pacientes a condições de maior risco, mas se expressam por manifestações clínicas subjetivas como no relato de dor articular ou muscular, entre tantos outros. Outros efeitos adversos medidos por exames complementares assumem importância maior em pacientes que apresentam condições basais de morbidade que podem ter ação somatória com esses efeitos adversos. Em decorrência da não participação de pacientes com condições óbvias de comorbidades, tinha-se uma estimativa de baixa frequência de eventos adversos graves. De fato, não houve condição que indicasse interrupção do esquema terapêutico nos pacientes do estudo em qualquer dos grupos de tratamento.

Nos estudos publicados, utilizando-se o Leishvacin[®] no tratamento ou na profilaxia das leishmanioses, poucos e raros efeitos adversos são relatados (NASCIMENTO *et al.*, 1990; GENARO, 1996; MARZOCHI *et al.*, 1998).

A incidência de eventos adversos foi diferente nos dois grupos, sempre com o Glucantime[®] associado a maior diversidade e presença desses eventos. Numa primeira análise descritiva para cada grupo de tratamento em separado, observa-se no grupo L que maior diversidade de eventos esteve presente num primeiro momento de avaliação (D10) em relação ao segundo momento (D20), esse coincidente com o término da aplicação do medicamento. Cefaléia, dor à aplicação e alteração do sono estiveram presentes em mais de 10% dos pacientes e nos dois momentos de avaliação. Uma frequência mais alta e inesperada de prurido foi registrada em D20. Uma possível resposta inflamatória dependente da liberação de citocinas em decorrência da aplicação de antígenos parasitários poderia induzir manifestações clínicas inespecíficas como febre, sensação subjetiva de mal estar, inclusive artralgia e mialgia. Mas, de forma geral, os dados para o grupo L foram pouco consistentes para considerações sobre hipóteses. Com relação ao grupo G, o quadro geral apresentado de manifestações está de acordo com outras publicações (MARSDEN, 1985; SALDANHA *et al.*, 1999; DEPS *et al.*, 2000). Importante observar que os eventos adversos presentes em D10 e D20 estavam ausentes ou bem reduzidos em importância em D50, mostrando a sua transitoriedade. Alteração no peso é a exceção, mas parece significar apenas um tempo maior necessário para o total retorno à normalidade. O quadro de herpes zoster ocorreu no último dia da série de um paciente em uso de Glucantime[®], e que

era o de maior idade, considerando-se os dois grupos. O paciente apresentou evolução clínica satisfatória, com regressão total das lesões de herpes zoster e também da lesão de LC na consulta de D50, sem apresentar seqüela dolorosa.

A análise comparativa da freqüência global de eventos adversos nos dois grupos evidencia as diferenças sugeridas nas análises descritivas. Várias são as manifestações que incidem com diferença significativa entre os dois grupos, todas de maior ocorrência com o Glucantime®. Artralgia é sempre de alta prevalência nas séries relatadas, mas surpreende o encontro de percentuais tão elevados nesse estudo, considerando a média de idade dos pacientes em torno de 37 anos. Observa-se ainda que certas diferenças não presentes são provavelmente decorrentes da amostra composta de poucos indivíduos por subgrupo, como por exemplo, os sintomas relacionados ao aparelho digestivo. Considera-se como um dado positivo o relato apenas esporádico de queixas como palpitação, talvez em decorrência das condições anteriormente comentadas, baixa idade e ausência de doenças de base.

Os efeitos adversos medidos por exames de laboratório foram analisados por grupo de tratamento, com a finalidade de se ter uma avaliação evolutiva dos resultados dos exames. Optou-se pela exclusão dos resultados de D50, apesar de efetivamente ter se executado a avaliação nesse dia, pois naquele momento os pacientes estavam há um mês sem aplicação do medicamento e as alterações que ocorreram, não mais estavam presentes. Com exceção da dosagem de fosfatase alcalina no grupo G que se mostrou ainda elevada em patamares semelhantes ao da avaliação anterior em D20, o que estaria provavelmente relacionado à presença de depósito do medicamento no fígado

(BERMAN, 1985). No grupo L, os exames realizados tiveram resultados sem alteração no conjunto, com médias semelhantes no pré-tratamento e durante o mesmo em duas fases distintas, meio e fim. Apenas na avaliação dos neutrófilos há uma aparente tendência evolutiva de redução da contagem dessas células, talvez sem significância nessa análise em decorrência do tamanho da amostra. No grupo G, houve alteração evolutiva nas dosagens de alanina aminotransferase (ALT OU TGP) e amilase, no hematócrito e na contagem de leucócitos, sem alteração correspondente dos neutrófilos. A alteração em dosagens de enzimas hepáticas é conhecida como manifestação decorrente do uso dos antimoniais pentavalentes, também relacionada à presença da droga no fígado em proporção não de todo conhecida, mas que certamente está associada com o efeito terapêutico (SALDANHA *et al.*, 2000; DEPS *et al.*, 2000; BERMAN, 1985; BERMAN, 1988). Nessa série, apesar do citado em relação ao aumento da fosfatase alcalina, não se encontrou diferença na avaliação evolutiva. Quanto às alterações de células de sangue periférico, são também conhecidas essas alterações, que raramente se associam a complicação clínica, são transitórias e inconstantes em sua manifestação (BRACONIER & MIÖRNER, 1993; Berman, 1988; Berman 1996). Observa-se aqui que as alterações nessa fase relatada não se associaram a manifestação clínica, mesmo com relação à elevação da amilase, essa transitória, já regredindo durante o uso do medicamento e não relacionada a eventos adversos do aparelho digestivo medidos por observação clínica, como já mostrado em outros estudos (HUEB *et al.*, 1998; SALDANHA *et al.* 2000; LAWN *et al.*, 2006).

Conclui-se pelos resultados obtidos nesse estudo que a intervenção realizada utilizando-se o Leishvacin[®] na imunoterapia da leishmaniose cutânea não encontrou os resultados esperados segundo a proposta inicial do estudo e não confirmou os resultados anteriormente relatados na literatura. Há hipóteses a serem consideradas para essa diferença, dentre elas a possibilidade de incidência de cicatrização espontânea naqueles grupos anteriormente avaliados, pois os esquemas utilizados eram muito prolongados, e esse fator não avaliado pode ter contribuído para as taxas de cura clínica observadas. Mas também é possível que taxas maiores de cura clínica possam ser obtidas com propostas terapêuticas de uso mais prolongado da imunoterapia, por características próprias dessa modalidade terapêutica, condição não avaliada no estudo atual. Deve-se ponderar, se considerada esta uma hipótese aceitável, se haveria interesse em se testar um esquema para uso por tempo indeterminado, a depender da resposta individual.

A taxa de cura obtida com o uso do Glucantime[®] no grupo de comparação mostrou-se dentro de padrões conhecidos e que podem ser considerados adequados para um tratamento de primeira linha. Mas, a preocupação que cerca o uso dos antimoniais permanece como uma condição estimuladora para o desenvolvimento de estudos de avaliação de alternativas terapêuticas. Não se modificou a condição existente, ou seja, o medicamento hoje disponível é de uso parenteral e relativamente prolongado, considerando-se a necessidade de comparecimento a serviços de saúde. É também associado frequentemente a eventos adversos, potencialmente de risco para uma parcela de pacientes

não abordados nesse estudo, mas sempre presentes em casuísticas não restritivas, representados, por exemplo, por pacientes com idade avançada e condições de co-morbidade. Observa-se que nas condições aqui relatadas de uso do antimonial, não se registrou qualquer evento adverso considerado grave.

Considerando os resultados satisfatórios obtidos em outros estudos e discordantes do aqui apresentado, é possível que em condições muito particulares a imunoterapia pudesse ser testada, como na contra-indicação ao uso dos antimoniais ou nas situações de imunossupressão associada. Na perspectiva atual, não há evidências que justifiquem seu uso nem mesmo nas condições citadas.

6. CONCLUSÕES

A taxa de cura obtida com o uso do Leishvacin[®] foi inferior à taxa de cura estimada para realização do estudo.

A taxa de cura obtida com o uso do Leishvacin[®] foi inferior à obtida com o uso do Glucantime[®] em todas as análises realizadas.

Com relação à toxicidade, o esquema utilizado com o Leishvacin[®] mostrou-se seguro e a frequência de eventos adversos foi menor no grupo de pacientes em uso do Leishvacin[®] quando comparado ao grupo com Glucantime[®].

Pelos resultados aqui relatados, certamente o uso do Leishvacin[®] não estaria indicado para o tratamento da leishmaniose cutânea como uma droga de segunda linha dentro das alternativas terapêuticas que o MS disponibiliza.

Esses resultados são válidos para cenários de ocorrência de LC com padrão epidemiológico semelhante, ou seja, predomínio em pacientes masculinos, jovens, com LC localizada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

7. RESUMO

O antimonial pentavalente, indicado como tratamento de escolha para a leishmaniose tegumentar americana (LTA), é um medicamento eficaz, mas de toxicidade elevada. A resposta imune estabelecida pelo homem diante de uma infecção por *Leishmania* é fator determinante para a evolução dessa infecção. Assim, pode ser considerada de interesse a avaliação de uma modalidade de tratamento capaz de induzir uma resposta imune associada à regressão de lesões e proteção, o que por hipótese poderia ocorrer com a estimulação antigênica resultante do uso de uma vacina antileishmaniose. Estudos relatados com uma vacina produzida no Brasil, inicialmente avaliada para a profilaxia da LTA e posteriormente para a terapia da doença, mostraram resultados satisfatórios. Nesses trabalhos, o uso do Leishvacin[®] associou-se a taxas de cura semelhantes às obtidas com os antimoniais, mas sempre se utilizando esquemas prolongados, nos quais as séries eram várias vezes repetidas. Com a proposta de se avaliar a eficácia do uso do Leishvacin[®] como imunoterapia na leishmaniose cutânea, conduziu-se um ensaio clínico controlado e randomizado, aberto em decorrência da diferença das vias de administração dos medicamentos em comparação. Considerou-se como essencial que o esquema terapêutico a ser utilizado fosse aplicável em situações habituais de assistência aos pacientes com LTA. A amostra inicialmente planejada foi modificada após uma análise intermediária que mostrou resultados conclusivos quanto ao desfecho, não havendo justificativa ética para a continuidade do estudo. Foram tratados 34 pacientes com Leishvacin[®] e 32 pacientes com Glucantime[®] em série única de 20 dias, com

administração diária supervisionada dos medicamentos. Eram na maioria do sexo masculino (92,4%), com idade variando de 20 a 50 anos (72,7%). Todos tiveram algum exame parasitológico positivo, 92,2% com identificação do parasito por PCR, todos pertencentes ao complexo *Viannia*. Os pacientes foram avaliados quanto ao desfecho principal cura ou falha terapêutica ao final da série e a cada 30 dias, com tempo máximo de 90 dias de observação após a medicação. Numa análise de intenção de tratar, apresentaram cura clínica 20,6% dos pacientes do grupo do Leishvacin[®] e 81,3% dos pacientes do grupo do Glucantime[®] ($p < 0,001$). O risco relativo de apresentar falha foi 4,25 vezes maior no grupo do Leishvacin[®] e a média de tempo para a ocorrência de falha terapêutica foi de 12,3 semanas (11,4; 13,3) e de 14,5 (13,6; 15,1) nos grupos do Leishvacin[®] e do Glucantime[®], respectivamente. O efeito do tratamento manteve-se como significativo após ajuste numa análise de regressão logística. O uso do Leishvacin[®] esteve associado a uma frequência baixa de eventos adversos sistêmicos. O uso do antimonial associou-se a frequência elevada de artralgia e mialgia, sintomas digestivos e confirmou a já relatada tendência de elevação da amilase sérica e enzimas hepáticas. Não houve indicação de interrupção dos esquemas terapêuticos para pacientes do estudo. O Leishvacin[®] não se mostrou como uma alternativa de tratamento da leishmaniose cutânea localizada no esquema e dose utilizados no presente ensaio clínico.

8. SUMMARY

Pentavalent antimonial is the first-choice drug for the treatment of American tegumentary leishmaniasis (ATL) but it causes relevant toxicity. The immune response established by the host constitutes a determinant factor for the evolution of this infection. Thus, it is an important goal to evaluate alternative treatments that could induce lesion healing, hypothetically, this situation would be achievable through the use of anti-leishmanial vaccination. Some reports on studies carried out with a vaccine produced in Brazil, used as a prophylactic or therapeutic against leishmaniasis, had shown good results. In those reports, cure rates with Leishvacin[®] were similar to the cure rates observed with pentavalent antimonial treatment, but the patient exposure to Leishvacin[®] was longer and repeated compared to the exposure to antimonial. To evaluate the effectiveness of the use of the Leishvacin[®] as immunotherapy for cutaneous leishmaniasis, we conducted an open-label controlled randomized clinical trial, considering the difference in the administration route of Leishvacin[®] and Glucantime[®]. It was considered essential to evaluate a feasible schedule to be used in common health-care facilities which take care of the patients with ATL. An interim analysis supported the interruption of the study because of a clear inferiority observed in the immunotherapy arm. Thirty-four and thirty-two patients were submitted to Leishvacin[®] and Glucantime[®] treatment, respectively, in only one series of 20 days, with supervised daily administration. The patients were mainly male (92.4%), with age range from 20 to 50 years (72.7%). All had had confirmation of the diagnosis based on parasitological tests, 92.2% with identification of the parasite by the PCR

assay. All identified parasites belong to the *Viannia* complex. Main outcomes were diagnosed by clinical criteria at the end of the treatment series and every 30 days thereafter. The total follow-up after treatment was three months. Intention-to-treat analysis showed cure rate of 20.6% in the Leishvacin[®] group and of 81.3% in the Glucantime[®] group ($p < 0.001$). The relative risk of failure was 4.25 times higher in the Leishvacin[®] group and the mean time-to-failure were 12.3 weeks (11.4; 13.3) and 14.5 (13.6; 15.1) for Leishvacin[®] and Glucantime[®], respectively. The effect of the treatment remained significant after adjusting by relevant co-variables in a logistic regression model. The use of Leishvacin[®] was associated with a low frequency of systemic adverse events. Glucantime[®] group showed higher frequency of arthralgia and myalgia, dyspeptic symptoms and abnormal serum amylase and hepatic enzymes levels without clinical symptoms. There was no need of Glucantime[®] interruption because of adverse events. Concluding, our results with Leishvacin[®] do not suggest that it could be an alternative against cutaneous leishmaniasis in the treatment schedule and dose used in the present trial.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMAN, D.G. & DORÉ, C.J. Randomisation and baseline comparisons in clinical trials. **Lancet**, v. 335, p. 149-153, 1990.
- ANDERSEN, E.M.; CRUZ-SALDARRIAGA, M.; LLANOS-CUENTAS, A.; LUZ-CJUNO, M.; ECHEVERRIA, J.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; COLINA, O.; BERMAN, J.D. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for peruvian cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, p. 133-137, 2005.
- ANDRADE, A.S.R.; FERNANDES, O.; HUEB, M.; CARVALHO, M.L.R.; FONTES, C.J.; MELO, M.N. The use of radionuclide DNA probe technology for epidemiological studies of tegumentary leishmaniasis in Mato Grosso state. **Braz. Arch. Biol. Tech.**, v. 48 (Spe2), p. 201-204, 2005.
- ANTUNES, C.M.F.; MAYRINK, W.; MAGALHÃES, P.A.; COSTA, C.A.; MELO, N.A.; DIAS, M.; MICHALICK, M.S.M.; WILLIAMS, P.; LIMA, A.O.; VIEIRA, J.B. Controlled field trials of a vaccine against new world cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Epidemiol.**, v. 15, p. 572-80, 1986.
- ARANA, B.A.; NAVIN, T.R.; ARANA, F.E.; BERMAN, J.D.; ROSENKAIMER, F. Efficacy of a short course (10 days) of meglumine antimonite with or

without interferon- γ in treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala.

Clin. Infect. Dis., v. 18, p. 381-384, 1994.

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control.

Clin Dermatol., v. 24, p. 523-532, 1996.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; McMAHON-PRATT, D.; JESUS, A.R. de; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL NETTO, E.M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON JUNIOR, W. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, p. 536-546, 1991.

BARRAL A., COSTA J.M., BITTENCOURT A.L., BARRAL-NETTO M., CARVALHO E.M. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. **Int. J. Dermatol.**, v. 34, p. 474-479, 1995.

BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E.M.; BARRAL, A. Human_Leishmaniasis@cytokines.bahia.br. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 140-55, 1998.

BASANO, S.A. & CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v.7, p. 328-337, 2004.

BERMAN, J.D.; WADDELL, D.; HANSON, B.D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of the sodium stibogluconate. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 27, p. 916-20, 1985.

BERMAN, J.D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Rev. Infect. Dis.**, v. 10, p. 560-86, 1988.

BERMAN, J.D. Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v. 14, p. 519-22, 1996.

BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 684-703, 1997.

BOMFIM, G.; NASCIMENTO, C.; COSTA, J.; CARVALHO, E.M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, v. 84, p. 188-194, 1996.

BORGES, V.C.; RUIZ, M.C.M.; GOMES, P.M.; COLOMBO, A.R.; SILVA, L.A.; ROMERO, H.D.; PRATA, A. Intradermorreação de Montenegro após sucessivas repetições do teste em Porteirinha, MG. **Rev. Soc. Bras. Med.Trop.**, v. 36, p. 249-251, 2002.

BRACONIER, J.H. & MIÖRNER, H. Recurrent episodes of thrombocytopenia during treatment with sodium stibogluconate. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 31, p. 187-188, 1993.

BRASIL. Conselho Nacional de Pesquisa. **Resolução 196/96** CNS. (1996)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. – Brasília, 2005. 816 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana**: diagnósticos clínico e diferencial. Brasília, 2006. 136 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. – Brasília, 2007. 182 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRETSCHKE, P.A.; ISMAIL, N.; MENON, J.N.; POWER, C.A.; UZONNA, J.; WEI, G. Vaccination against and treatment of tuberculosis, the leishmaniasis and AIDS: perspectives from basic immunology and immunity to chronic intracellular infections. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 58, p. 1879- 1896, 2001.

BRYCESSON, A.D.M.; CHULAY, J.D.; MUGAMBI, M.; WERE, J.B.; GACHIHI, G.; CHUNGE, C.N.; MUIGAI, R.; BHATT, S.M; HO M; SPENCER, H.C.; MEME, J.; ANABWANI, G. Visceral unresponsive to antimonial drug II: response to high dosage sodium stibogluconate or prolonged treatment with pentamidine. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, p. 705- 14, 1985.

CARVALHO, E.M.; JOHNSON, W.D.; BARRETO, E.; MARSDEN, P.D.; COSTA, J.M.L.; REED, S.; ROCHA, H. Cell mediated immunity in american cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Acta Trop.**, v. 56, p. 315- 325, 1985.

CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.L.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P.D. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.**, v. 56, p. 315-325, 1994.

CARVALHO, E.M.; CORREIA FILHO, D.; BACELLAR, O.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, H.; ROCHA, H. - Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, p. 273-277, 1995.

CARVALHO, M.L.R. **Aspectos da imunidade celular em pacientes com leishmaniose tegumentar americana, procedentes de área endêmica do estado de Mato Grosso, Brasil, antes e após o tratamento com antimônio pentavalente.** Tese (Doutorado em Medicina Tropical). Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG. Belo Horizonte, MG, 2000.

CARVALHO, M.L.R.; FONTES, C.J.F.; HUEB, M.; GUEDES, A.M.; AFONSO, L.C.C.; MELO, M.N. Leishmaniose tegumentar no estado de Mato Grosso (Brasil): estudo clínico, laboratorial e terapêutico. **An. Brasil. Dermatol.**, v. 77, p. 45-56, 2002.

CARVALHO, M.L.R., ANDRADE, A.S.R., FONTES, C.J.F., HUEB, M., SILVA, S.O., MELO, M.N. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. **Acta Trop.**, v. 98, p. 277-285, 2006.

CASTÉS, M.; AGNELLI, A., VERDE, O., RODÓN, A.J. Characterization of the cellular immune response in american cutaneous leishmaniasis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 27, p. 176-186, 1983.

CASTRO, C.; SAMPAIO, R.N.R.; MARSDEN, P.D. Severe arthralgia, not related to dose, associated with pentavalent antimonial therapy for mucosal leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, p. 362, 1990.

CHULAY, J.D.; SPENCER, H.C.; MUGAMBI, M. Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, p. 702-709, 1985.

CHULAY, J.D.; FLECKENSTEIN, L.; SMITH, D.H. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumina antimoniate. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p. 69-72, 1988.

CONVIT, J.; PINARD, M.E.; RONDÓN, A.J. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, p. 603-610, 1972.

CONVIT, J.; CASTELLANOS, P.L.; RONDON, A.; PINARD, M.E.; ULRICH, M.; CASTES, M.; BLOOM, B.R.; GARCIA, L. Immunotherapy versus chemotherapy in localized cutaneous leishmaniasis. **Lancet**, v. 1, p. 401-405, 1987.

CONVIT, J.; CASTELLANOS, P.L.; ULRICH, M.; CASTES, M.; RONDON, A.; PINARD, M.E.; RODRÍQUEZ, N.; BLOOM, B.R.; FORMICA, S.; VALECILLOS, L. Immunotherapy of localized, intermediate, and diffuse forms of American cutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis.**, v. 160, p. 104-115, 1989.

CONVIT, J.; ULRICH, M.; FERNÁNDEZ, C.T.; TAPIA, F.J.; CÁCERES-DITTMAR, G.; CASTÉS, M.; RONDÓN, A.J. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, p. 444-448, 1993.

COSTA, J.M.L.; MARSDEN, P.D.; LLANOS-CUENTAS, E.A.; NETTO, E.M.; CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; ROSA, A.C.; CUBA, C.C.; MAGALHÃES, A.V.; BARRETO, A.C. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, p. 319-323, 1986.

COSTA, J.M.L.; NETTO, E.M.; VALE, K.C.; OSAKI, N.K.; TADA, M.S.; MARSDEN, P.D. - Spontaneous healing of cutaneous *Leishmania braziliensis braziliensis* ulcers. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 606, 1987.

COSTA, J.M.L.; TADA, M.S.; NETTO, E.M.; VALE, K.C.; LAGO, E.L.; MARSDEN, P.D. Procedência de pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana nas áreas endêmicas de Três Braços e Corte de Pedra-Estado da Bahia-Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 21, p. 145-49, 1988.

COSTA, J.M.L.; SALDANHA, A.C.R.; SILVA, A.C.M.; SERRA NETO, A.; GALVÃO, C.E.S.; SILVA, C.M.P.; SILVA, A.R. Estado atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão. II. Aspectos epidemiológicos e clínico-evolutivos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 25, p. 115-123, 1992.

COSTA, J.M. O uso clínico das pentamidinas (isotionato de pentamidina) com especial referência nas leishmanioses. **Acta Amazônica**, v. 23, p. 163- 172, 1993.

COSTA, J.M., MORAES, M.S., SALDANHA, A.C., BARRAL, A., BURATTINI, M.N. Diabetes mellitus associated with pentamidine isethionate in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 28, p. 405-407, 1995.

COSTA, J. M. L; Cunha, A.K.; Gama, M.E.A.; Barral. A. Leishmaniose cutânea difusa no Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, v. 73, p. 567-576, 1998.

COSTA, J.M.L.; MENDES, S.; MELO, L.S.; FIGUEIREDO, I.; REBÊLO, J.M.M.;
SALDANHA, A.C. ; GAMA, M.E.A. ; BARRAL, A. Tratamento da
leishmaniose cutânea difusa (LCD) com a associação antimoniato-N-
metilglucamina (Glucantime®) e sulfato de paramomicina (Gabbrox®).
An. Bras. Dermatol., v. 741, p. 63-67, 1999.

CROFT, S.L.; YARDLEY, V. & KENDRICK, H. Drug sensitivity of *Leishmania*
species: some unresolved problems. **Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.**,
v. 96, p. S1/127-S1/129, 2002.

DA-CRUZ, A.M.; BITTAR, R.; MATTOS, M.; OLIVEIRA NETO, M.P.;
NOGUEIRA, R.; PINHO-RIBEIRO, V.; AZEREDO-COUTINHO, R.B.;
COUTINHO, S.G. T-cell-mediated immune responses in patients with
cutaneous or mucosal leishmaniasis: longterm evaluation after therapy.
Clin. Diagn. Lab. Immunol, v. 9, p. 251-256, 2002.

DE LUCA, P.M.; MENDONÇA, S.C.F.; SANTIAGO, M.A.; COUTINHO, S.G.;
PINTO, J.; GENARO, O.; COSTA, C.A.; TOLEDO, V.P.C.P.; MAYRINK, W.
Phase II trial with Biobras vaccine against leishmaniasis. **Mem. Inst.**
Oswaldo Cruz, v. 92(s.1), p. 208, 1997.

DE LUCA, P.M.; MAYRINK, W.; ALVES, C.R.; COUTINHO, S.G.; OLIVEIRA, M.P.; BERTHO A.L.; TOLEDO, V.P.C.P.; COSTA, C.A.; GENARO, O.; MENDONÇA, S.C.F. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and non-autoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. **Vaccine**, v. 17, p. 1179-1185, 1999.

DE PAULA, C.D.R.; SAMPAIO, J.H.D.; CARDOSO, D.R.; SAMPAIO, R.N.R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 365-371, 2003.

DEPS, P.D.; VIANA, M.C.; FALQUETO, A.; DIETZE, R. Avaliação comparativa da eficácia e toxicidade do antimoniato n-metil glucamina e do estibogluconato de sódio BP 88® no tratamento da LCL. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, p. 535- 543, 2000.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Stat Q**, v. 45, p. 267- 275, 1992.

DESJEUX, P. Leishmaniasis, public health aspects and control. **Clin. Dermatol.**, v. 14, p. 417-423, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, p. 305–318, 2004.

ENGERS, H.D.; BERGQUIST, R.; MODABBER, F. Progress on vaccines against parasites. **Dev. Biol. Stand.**, v. 87, p. 73-84, 1996.

EVANS, D. Solutions culture medium. In: **Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of Leishmania**. Geneva,WHO, 1989. p.28-32. (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases/ TDR, 1211).

FALQUETO, A.; RODRIGUES-COURA, J.; BARROS, G.C.; GRIMALDI JUNIOR, G.; SESSA, P.A.; CARIAS, V.R.D.; DE-JESUS, A.C.; AL ENCAR, J.T.A. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 155-163, 1986.

FALQUETO, A.; SESSA, P.A.; FERREIRA, A.L.; VIEIRA, V.P.; SANTOS, C.B.; VAREJÃO, J.B.M.; CUPOLILLO, E.; PORROZZI, R.; CARVALHO-PAES, L.E.; GRIMALDI JUNIOR, G. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 8, p. 1003-1010, 2003.

FAVALI, C.; COSTA, D.; AFONSO, L.; CONCEIÇÃO, V.; ROSATO, A.; OLIVEIRA, F.; COSTA, J.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.I. Role of costimulatory molecules in immune response of patients with cutaneous leishmaniasis. **Microbes Infect.**, v. 7, p. 86-92, 2005.

FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W. **Epidemiologia Clínica**: elementos essenciais. Trad. Roberta Marshier Martins. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 288p.

FOLLADOR, I.; ARAUJO, C.; BACELLAR, O.; ARAUJO, C.B.; CARVALHO, L.P.; ALMEIDA, R.P.; CARVALHO, E.M. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. **Clin. Infect. Dis.**, v.34, p. 54-58, 2002.

FRANKE, E.D.; WIGNALL, F.S.; CRUZ, M.E.; ROSALES, E.; TOVAR, A.A.; LUCAS, C.M.; LLANOS-CUENTAS, A.; BERMAN, J.D. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. **Ann. Inter. Med.**, v. 113, p. 934- 940, 1990.

GASSER, R.A.; MAGILL, A.J.; OSTER, C.N.; FRANKE, E.D.; GRÖGL, M.; BERMAN, J.D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 18, p. 83-90, 1994.

GENARO, O.; TOLEDO, V.P.C.P.; DA COSTA, C.A.; HERMETO, M.V.; MAYRINK, W. Vaccine for profilaxis and immunotherapy, Brazil. **Clin. Dermatol.**, v. 14, p. 503-12, 1996.

GRAPHPAD SOFTWARE. QuickCalcs - Online Calculator for Scientists. Disponível em: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>. Acesso em outubro de 2004.

GRIMALDI, G.; TESH, A.B.; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 41, p. 687-725, 1989.

GRIMALDI, G.; TESH, A.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 230-250, 1993.

GOODWIN LG. Pentostan R (sodium stibogluconate): a 50- years personal reminiscence. **Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, p.339-341, 1995.

HERMETO MV, VIEIRA-DIAS D, TOLEDO VPCP ET AL. Immune responses in humans vaccinated with different forms of a killed *Leishmania* promastigotes vaccine. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 519-521, 1994.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet** v. 354, p. 1191-1199, 1999.

HUEB, M.; MUNHOZ JUNIOR, S.; HIJO, A.V.E.; NAKATA, T.F.; FONTES, C.J.F.; CUNHA, M.L.O.N; FERREIRA, L.S.; MELO, M.N. - Leishmaniose tegumentar em Mato Grosso: distribuição dos casos e sua relação com atividade profissional. In: Congresso Brasileiro de epidemiologia, 3/ Congresso Ibero-Americano, 2/ Congresso Latino Americano, 1, Salvador, BA, 1995. **Resumos.** Salvador, 1995. p. 457. (Comunicação Coordenada, 41)

HUEB, M. Treatment of Leishmaniasis: Preliminary Observations of the Use of Stibogluconate in Mato Grosso, Brazil. **Acta Parasitol. Turc.**, v. 21 (supl.1): p. 173, 1997a.

HUEB, M.; MUNHOZ JUNIOR, S.; NAKATA, T.S.; ESCALANTE HIJO, A.V.; LOPES, F.A.; FONTES, C.J.F. - Relato de 2 casos de leishmaniose cutânea disseminada. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 33, Belo Horizonte, 1997. Temas Livres e Sessão Posters. Belo Horizonte, Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1997b. p.181. (Poster, 18).

HUEB, M., 1997. **Leishmaniose Tegumentar em Mato Grosso**: aspectos do diagnóstico clínico e laboratorial de pacientes atendidos no serviço de referência para Leishmanioses do hospital Júlio Müller. Cuiabá. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Mato Grosso, 1–110. 1997c.

HUEB, M.; DINIZ, L.A.; FIRMIANO, A.A.; RODRIGUES, D.M.S.; FERREIRA, J.F.; SANTOS, J.A.; FONTES, C.J.F. Amilase sérica em pacientes em uso de stibogluconato de sódio. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 31 (supl.I): 169, 1998a.

HUEB, M.; LIMA, R.M.B.; LINS, G.; FERREIRA, J.F.; RODRIGUES, D.M.S.; SANTOS, J.A.; FONTES, C.J.F. Efeitos adversos associados ao uso de stibogluconato de sódio. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 31 (supl.I): 170, 1998b.

HUEB, M.; DINIZ, L.A.; FIRMIANO, A.A.; RODRIGUES, D.M.S.; FERREIRA, J.F.; SANTOS, J.A.; FONTES, C.J.F. Amilase sérica em pacientes em uso de stibogluconato de sódio. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 31 (supl.I): 169, 1998c.

KAWA, H.; SABROZA, P.C. Espacialização da leishmaniose tegumentar na cidade do Rio de Janeiro. **Cad. Saúde Públ.**, v. 18, p. 853-865, 2002.

JONES, T.C.; JOHNSON, W.D.; BARRETO, A.C.; LAGO, E.L.; BADARO, R.; CERF, B.; REED, S.G.; NETTO, E.M.; TADA, M.S.; FRANÇA, F.; WIESE, K.; GOLIGHTLY, L.; FIKRIG, E.; COSTA, J.M.L.; CUBA, C.C.; MARSDEN, P.D. Epidemiology of american cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **J. Inf. Dis.**, v. 156, p. 73-83, 1987.

LAI A FAT, E.J.S.K.; VREDE, M.A.; SOETOSENOJO, R.M.; LAI A FAT, R.F.M.
Pentamidine, the drug of choice for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Surinam. **Intern. J. Dermatol.**, v. 41, p. 796–800, 2002.

LAINSON R & SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick K. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press, 1987.

LAINSON R & SHAW JJ. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. *Ciência e Cultura*, v. 44, p. 94-106, 1992.

LAINSON, R., SHAW, J.J., SILVEIRA, F.T., SOUZA, A.A.A., BRAGA, R.R., ISHIKAWA, E.A.Y. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special refernce to the eco-epidemiology of the diasease in Amazonia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 89: 435–443, 1994.

LAMBERTUCCI, J.R.; FRANÇA, B.M.; QUEIROZ, E.M. Acute pancreatitis caused by meglumine antimoniate given for the treatment of visceral leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.37, p.74-75, 2004.

LAWN, S.D.; ARMSTRONG, M.; CHILTON, D.; WHITTY C.J.M. Electrocardiographic and biochemical adverse effects of sodium stibogluconate during treatment of cutaneous and mucosal

leishmaniasis among returned travelers. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, p. 264–269, 2006.

LEE SA, HASBUN R. Therapy of cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Dis.**, v. 7, p. 86-93, 2003.

LLANOS-CUENTAS EA, MARSDEN PD, CUBA CC, BARRETO AC, CAMPOS M. Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. **Lancet.**, 8397: 295, 1984.

LLANOS-CUENTAS, E.A.; MARSDEN, P.D.; LAGO, E.L.; BARRETO, A.C.; CUBA, C.C.; JOHNSON, W.D. - Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia - Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. II. Cutaneous disease. Presentation and evolution. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 17: 169-177, 1984a.

LLANOS-CUENTAS, E.A.; CUBA, C.C.; BARRETO, A.C.; MARSDEN, P.D. - Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 78: 845-846, 1984b.

LUJÁN, L.A.V. Avaliação da influência da infecção bacteriana secundária na evolução da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em Corte de Pedra, Bahia, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, p. 101-102, 2000. RESUMO DE TESE.

MACHADO P, ARAUJO 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.**, v. 34: p. 69-73, 2002.

MACHADO-COELHO, G.L.L.; CAIAFFA, W.T.; GENARO, O; MAGALHÃES P.A.; MAYRINK, W. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. **Trans. R Soc. Trop Med. Hyg.**, v. 99, p. 55-61, 2005.

MACHADO-PINTO, J.; PINTO, J.; COSTA, C.A.; GENARO, O.; MARQUES, M.J.; MODABBER, F.; MAYRINK, W. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. **Int. J. Dermatol.**, 41: 73-78, 2002.

MARSDEN, P.D.; LLANOS-CUENTAS, E.A.; LAGO, E.L.; CUBA, C.C.; BARRETO, A.C.; COSTA, J.M.; JONES, T.C. - Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia - Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. III. Mucosal disease presentation and initial evolution. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 17: 179-186, 1984.

MARSDEN, P.D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 18, p.187- 198, 1985a.

MARSDEN, P.D. Clinical presentation of *Leishmania braziliensis braziliensis*.
Parasitol. Today. V. 1, p. 129- 133, 1985b.

MARSDEN PD. Mucosal leishmaniasis (*espundia*, Escomel, 1911). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 859-876, 1986.

MARSDEN PD. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Três Braços, Bahia-Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 27, p. 93-101, 1994a.

MARSDEN, P.D. - Personal experience with diagnostic and therapeutic aspects of human *Leishmania (viannia) braziliensis* in Três Braços. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 485-487, 1994b.

MARZOCHI, M.C. & MARZOCHI, K.B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad. Saude Publ.**, v. 10(Sup. 2), p.359-375, 1994.

MARZOCHI KBF, MARZOCHI MCA, SILVA AF, ET AL. Phase I studies for the Leishvacin (killed *Leishmania* vaccine) in Brazil. Workshop on vaccine efficacy trial against leishmaniasis. Bahia- Brasil, 1995.

MARZOCHI KBF, MARZOCHI MCA, SILVA AF, GRATIVO N, DUARTE R, CONFORT EM, MODABBER F. Phase I study of an inactivated vaccine

against leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 205- 212, 1998.

MARZOCHI, M. C. A.; SCHUBACH, A.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmaniose tegumentar americana. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999. p65-80.

MATTOS, M.S. - Aspectos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana: casuística do Hospital Evandro Chagas/FIOCRUZ/RJ no período de 1987 a dezembro de 1991. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 26: 261-262, 1993.

MAYRINK W, MAGALHÃES PA, DIAS M, COSTA CA DA, MELO MN, DE OLIVEIRA LIMA A . Responses to Montenegro antigen after immunization with killed *Leishmania* promastigotas. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 72:676, 1978.

MAYRINK W, COSTA CA DA, MAGALHÃES PA, MELO MN, DIAS M, DE OLIVEIRA LIMA A, MICHALIK MS, WILLIAMS P. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 73:385-387, 1979.

MAYRINK W, MICHALIK MS, MELO MN, WILLIAMS P, COSTA CA DA, MAGALHÃES PA, DIAS M, DE OLIVEIRA LIMA A, , CARVALHO EF,

BARROS GC, SESSA PA, DE ALENCAR JTA. (1985) An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espírito Santo, Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 79, p259-269.

MAYRINK, W.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; WILLIANS, P.; NASCIMENTO, E.; MAGALHÃES, P.A.; DA-COSTA, C.A.; OLIVEIRA-LIMA, A.; DIAS, M. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana utilizando vacina. **An. Bras. Dermatol.**, v. 66. p. 55-59, 1991.

MAYRINK, W.; MAGALHÃES, P.A.; MICHALICK, M.S.M.; DA-COSTA, C.A.; OLIVEIRA-LIMA, A.; MELO, M.N.; TOLEDO, V.P.C.P.; NASCIMENTO, E.; DIAS, M.; GENARO, O.; HERMETO, M.V.; WILLIANS, P. Immunotherapy as a treatment of American cutaneous leishmaniasis: preliminary studies in Brazil. **Parassitologia**, v. 34, p. 159-165, 1992.

MAYRINK, W. & MAGALHÃES, P.A. Leishmaniose: uma experiência de trinta e quatro anos com uma vacina antileishmaniose tegumentar americana. **Relatório**. Belo Horizonte, 1999a. Relatório. Mimeografado.

MAYRINK W, PINTO J, DA COSTA C, TOLEDO V, GUIMARÃES T, GENARO O, VILELA L. Short report: evaluation of the potency and stability of a candidate vaccine against American cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 294- 295, 1999b.

MELO MN, MAYRINK W, COSTA CA, MAGALHÃES PA, DIAS M, WILLIAMS P, ARAÚJO FG, COELHO MV, BATISTA, SM. Padronização do antígeno de Montenegro. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 19: 161-164, 1977.

MENDONÇA SCF, DE LUCA PM, MAYRINK W, ET AL. Characterization of the cell-mediated immune responses induced by a vaccine against American Tegumentary leishmaniasis in humans. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 46, 1993.

MENDONÇA SCF, DE LUCA PM, MAYRINK W, RESTOM, T.G.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; DA-CRUZ, A.M.; BERTHO, A.L.; COSTA, C.A.; GENATO, O.; TOLEDO, V.P.C.; COUTINHO, S.G. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, p. 195-201, 1995.

MENDONÇA SCF, DE LUCA PM, MAYRINK W, COUTINHO SG, OLIVEIRA MP, BERTHO AL, TOLEDO VPCP, COSTA CA, GENARO O. Comparison between autoclaved and non-autoclaved preparations of vaccine against American cutaneous leishmaniasis with regard to immunogenicity. **Acta Parasitol Turcica**, v. 21, p. 11, 1997.

MICHALICK, M.S.M.; MAYRINK, W.; MAGALHÃES, P.A.; DA-COSTA, C.A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; WILLIAMS, P.; SANTOS, P.H. (1987) Imunoterapia na leishmaniose tegumentar Americana. In: Congresso da

Sociedade Brasileira de Parasitologia, X, 1987, Salvador. **Anais...** 1987. p. 119.

MODABBER F. Experiences with vaccines against cutaneous leishmaniasis: of men and mice. **Parasitol. Today** 98: S49- S60, 1989.

MORIZOT G, DELGIUDICE P, CAUMES E, LAFFITTE E, MARTY P, DUPUY A, SARFATI C, HADJ-RABIA S, DARIE H, LE GUERN AS, SALAH AB, PRATLONG F, DEDET JP, GROGL M, BUFFET PA. Healing of old world cutaneous leishmaniasis in travelers treated with fluconazole: drug effect or spontaneous evolution? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 76: 48-52, 2007.

MOSKOWITZ PF & KURBAN AK. Treatment of cutaneous leishmaniasis: retrospectives and advances for the 21st century. **Clin. Dermatol.**, v. 17, p. 305-15, 1999.

NASCIMENTO E, MAYRINK W, DA COSTA CA, MICHALICK MS, MELO MN, BARROS GC, DIAS M, ANTUNES CM, LIMA MS, TABOADA DC. (1990) Vaccination of humans against cutaneous leishmaniasis: cellular and humoral responses. **Infect Immunology** 58: 2198-2203.

NAVIN TR, ARANA BA, ARANA FE, BERMAN JD, CHAJÓN JF. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus

ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. 528- 534, 1992.

NETTO E.M., MARSDEN P.D., LLANOS-CUENTAS E.A., COSTA J.M., CUBA C.C., BARRETO A.C., BADARO R., JOHNSON W.D., JONES T.C. (1990). Long-term follow-up of patients with *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection and treated with Glucantime. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 84:367-70.

OLIVEIRA MC, AMORIM RFB, FREITAS RA, COSTA ALL. Óbito em casos de leishmaniose cutâneo-mucosa após o uso de antimonial pentavalente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 38(3):258-260, 2005.

OLIVEIRA-NETO MP, MATTOS MS, PEREZ MA, DA-CRUZ AM, FERNANDES O, MOREIRA J, GONÇALVES-COSTA SC, BRAHIN LR, MENEZES CR, PIRMEZ C. American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiological characteristics. **Int J Dermatol**, 39: 506-514, 2000.

OSORIO, L.E.; CASTILLO, C.M.; OCHOA, M.T. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia: clinical characteristics. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 49–52, 1998.

OSTER CN, CHULAY JD, HENDRICKS LD, PAMPLI CL, BALLOU WR, BERMAN JD, TAKAFUJI ET, TRAMONT EC, CANFIELD CJ. American Cutaneous

Leishmaniasis: A comparison of three sodium stibogluconate treatment schedules. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 34: 856- 860, 1985.

OULLETE M & PAPADOPOULOU B. (1993) Mechanisms of drug resistance in Leishmania. **Parasitol. Today** 9: 150-153.

PASSOS V.M.A., BARRETO S.M., ROMANHA A.J., KRETTLI A.U., VOLPINI A.C., GONTIJO C.M.F., FALCÃO A.L., LIMA-COSTA M.F.F. (2001). Leishmaniose tegumentar na Região Metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos (1989-1995) **Rev. Soc. Bras. Med. Trop** 34:5-12.

PESSÔA SB. Segunda nota sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com leptomonas mortas. **Rev. Paulista Med.**, v. 19, p. 1-9, 1941.

PESSÔA, S.B.; PESTANA, B.R. Ensaio sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com leptomonas mortas. **Rev. Biol. Hig.**, v. 10, p.112-118, 1940.

PETERSEN, E.A.; NEVA, F.A.; BARRAL, A.; CORREA-CORONAS, R.; BOGAERT-DIAZ, H.; MARTINEZ, D.; WARD, F.E. Monocyte suppression of antigen-specific lymphocyte responses in diffuse cutaneous leishmaniasis patients from the Dominican Republic. **J. Immunol.**, v. 132, p. 2603-2606, 1984.

PIRMEZ C, YAMAMURA M, UYEMURA K, PAES-OLIVEIRA M, CONCEICAO-SILVA F, MODLIN RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **J.Clin. Invest.** 91: 1390-1395, 1993.

POCOCK, S.J. **Clinical trials**: a practical approach. 5th ed. London: Great Britany Chichester, 1987. 265p. MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **J. Bras.Med.**, [S. l.]: 82-104, 1992.

POMPEU, M.M.L.; BRODSKYN, C.; TEIXEIRA, M.J.; CLARENCIO, J.; Van WEYENBERG, J.; COELHO C. B.; CARDOSO, S. A.; BARRAL A.; BARRAL-NETTO M. Differences in Gamma Interferon Production In Vitro Predict the Pace of the In Vivo Response to *Leishmania amazonensis* in Healthy Volunteers. **Infect. Immunity**: 7453–7460, 2001.

REES PH, KEATING MI, KAGER PA, HOCKMEYER WT. (1980) Renal clearence of pentavalent antimony (sodium stibogluconate). **Lancet** 8188: 226-228.

RIBEIRO, A.L.; DRUMMOND, J.B.; VOLPINI, A.C.; ANDRADE, A.C.; PASSOS, V.M. Electrocardiographic changes during low-dose, short-term therapy of cutaneous leishmaniasis with the pentavalent antimonial meglumine. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 297-301, 1999.

RIBEIRO-DE-JESUS A, ALMEIDA RP, LESSA H, BACELLAR O, CARVALHO EM.

Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**31: 143-148, 1998.

ROBLEDO, S.; WOZENCRAFT, A.; VALENCIA, A.Z; SARAVIA, N. Human Monocyte infection by *Leishmania (Viannia) panamensis*: role of complement receptors and correlation of susceptibility in vitro with clinical phenotype. **J. Immunol.**, v. 152, p. 1265-1276, 1994.

RODRIGUES, A.M., HUEB, M., NERY, A.F., FONTES, C.J.F., Possible cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors during treatment of american tegumentary leishmaniasis with meglumine antimoniate, **Acta Tropica**, v. 102, p.113–118, 2007.

ROMERO, G.A.; OLIVEIRA, MRF; CORREIA-FILHO D; MARSDEN, PD. Physico- chemical characteristics of meglumine antimoniate in different storage conditions. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop** 29: 461- 465, 1996.

ROMERO, G.A. **Estudo da doença cutânea causada por *L (V) braziliensis* e *L (V) guyanensis***. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília. Brasília-DF. 2000.

ROMERO, G.A.; GUERRA, M.V.; PAES, M.G.; MACEDO, V.O. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L.*

(V.) *guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, p. 456-465, 2001.

ROMERO, G.A.; FLORES, M.R.M.; NORONHA, E.F.; MACEDO, V.O. High frequency of skin reactions in patients with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate contaminated with heavy metals: a comparative approach using historical controls. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 145-149, 2003.

ROSA AC, CUBA CC, VEXANAT A, BARRETO AC, MARSDEN PD. Predominance of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the regions of Três Braços and Corte de Pedra, Bahia-Brasil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p. 409-410, 1988.

ROSE GA, BLACKBURN H. Métodos de encuesta sobre enfermedades cardiovasculares. 2ª ed. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1982.

SALDANHA, A.C.R.; ROMERO, G.A.; MERCHAN-HAMANN, E.; MAGALHÃES, A.V.; MACEDO, V.O. Estudo comparativo entre o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea: I. Eficácia e segurança. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 383-387, 1999.

SALDANHA, A.C.R.; ROMERO, G.A.; MERCHAN-HAMANN, E.; MAGALHÃES, A.V.; MACEDO, V.O. Estudo comparativo entre o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea: II. Toxicidade bioquímica e cardíaca. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, p. 383-388, 2000.

SANTOS, G.P.L.; SANAVRIA, A.; MARZOCHI, M.C.A.; SANTOS, E.G.O.B.; SILVA, V.L.; PACHECO, R.S.; MOUTA-CONFORT, E.; ESPÍNDOLA, C.B.; SOUZA, M.B.; PONTE, C.S.; CONCEIÇÃO, N.F.; ANDRADE, M.V. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, p. 161-166, 2005.

SANTRICH, C.; SEGURA I.; ARIAS A.L.; SARAVIA, N.G. Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 42, p. 51-55, 1990.

SARAVIA, N.G.; HOLGUIN, A.F.; MCMAHON-PRATT, D.; D'ALESSANDRO, A. Muco-cutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, p. 714-720, 1985.

SCOTT P, SACKS D, SHER A. Resistance to macrophage mediated killing as a factor influencing the pathogenesis of chronic cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 131, p. 966-971, 1983.

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.**, v. 168, p. 1675-1684, 1988.

SEATON, R.A.; MORRISON, J.; MAN, I.; WATSON, J.; NATHWANI, D.
Out-patient parenteral antimicrobial therapy: a viable option for the management of cutaneous leishmaniasis. **Q. J. M.**, v. 92, p. 659 – 667, 1999.

SESSA P.A.; FALQUETO, A.; VAREJÃO, J.B.M. Tentativa de controle da leishmaniose tegumentar americana por meio do tratamento dos cães doentes. **Cad. Saúde Públ.**, v.10, p. 457-463, 1994.

SHAW, J.J. & LAINSON, R. **Ecology and epidemiology** : New World. In : The Leishmaniasis. London, Peters, W. & Kilick-Kendrick, R., 1987. p.290-363. v.1.

SCHONIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHEWYNOCH, C.; SCHALLIG, H.D.F.H.; PRESBER, W.; JAFF, C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 47, p. 349-358, 2003.

SCHULZ, K.F. & GRIMES, D.A. Allocation concealment in randomised trials: defending against deciphering. **Lancet**, v. 359, p. 614–618, 2002.

SILVA-JUNIOR, J.B. Antimoniato de meglumina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 103-105, 2001.

SILVEIRA, F.T., ISHIKAWA, E.A., DE SOUZA, A.A., LAINSON, R. 2002. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belem, Para State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite** 9: 43–50.

SUNDAR, S.; AGRAWAL G.; RAI, M.; MAKHARIA, M.K.; MURRAY, H.W. Treatment of Indian visceral leishmaniasis with single or daily infusions of low dose liposomal amphotericin B: randomised trial. **B.M.J**, v. 323, p. 419–422, 2001.

SUNDAR, S.; MEHTA, H.; SURESH, A.V.; SINGH, S.P.; RAI, M.; MURRAY, H.W. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. **Clin Infect Dis.**, v. 38, p. 377-383, 2004.

THAKUR, C.P. Harmful effect of high stibogluconate treatment of Kala-azar in India. . **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 672- 673, 1986.

TOLEDO, V.P.C.P ; MAYRINK, W. ; VILELA, L. ; COSTA, C. A. ; HERMETO, M. V. ; GENARO, O. ; MICHALICK, M. S. M. ; NASCIMENTO, E. ; WILLIAMS, P. **Atividades no Ambulatório de Leishmanioses de Caratinga, Minas Gerais.** Belo Horizonte - MG: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 1993 (Relatório Técnico).

TORRÚS, D.; MASSA, B.; BOIX, V.; PORTILLA, J.; PÉREZ-MATEO, M. Meglumine antimoniate-induced pancreatitis. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 91, p. 820-821, 1996.

TURETZ ML, 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.** 186: 1829-1834, 2002.

VEIGA JP ET AL. (1983) Renal tubular dysfunction in patients with mucocutaneous leishmaniasis treated with pentavalent antimonials. **Lancet** 2: 569.

WEIGLE, K. & SARAIVA, N.G. Natural History, Clinical Evolution, and the Host-Parasite Interaction in New World Cutaneous Leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v. 14, p. 433-450, 1996.

WHO (World Health Organization) (1990). Control of the leishmaniasis. Technical Report Series 793, Geneva, 158pp.

WHO (World Health Organization) (2000). Fact Sheet 116, Revised May 2000, Geneva, 5 pp.

YARDLEY, V.; ORTUÑO, N.; LLANOS-CUENTAS, A.; CHAPPUIS, F.; DE-DONKER, S.; RAMIREZ, L.; CROFT, S.; AREVALO, J.; ADAUI, V.; BERMUDEZ, H.; DECUYPERE, S.; DUJARDIN, J.C. American tegumentary leishmaniasis: is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? **J. Infect. Dis.**, v. 194, p. 1168-1175, 2006.

DE WOLFF, F.A. Antimony and health. **B.M.J.**, v. 310, p. 1216-1217, 1995.

ANEXO 1

Relação dos casos de leishmaniose tegumentar por município de Mato Grosso, com a respectiva população e coeficiente de detecção de casos (por 100 mil hab).

Município	2004			2005			2006		
	Casos	POP	CD#	Casos	POP	CD#	Casos	POP	CD#
Acorizal	0	6.023	0,0	2	6.137	32,6	1	6.194	16,14
Água Boa	7	14.808	47,3	14	14.847	94,3	9	14.865	60,54
Alta Floresta	55	47.146	116,7	42	47.236	88,9	30	47.281	63,45
Alto Araguaia	11	11.667	94,3	17	11.812	143,9	16	11.884	134,63
Alto Boa Vista	32	3.959	808,3	28	4.359	642,3	40	4.565	876,23
Alto Garças	1	8.342	12,0	1	8.345	12,0	0	8.348	0,00
Alto Paraguai	12	7.012	171,1	8	6.147	130,1	4	5.704	70,13
Alto Taquari	6	5.067	118,4	0	5.395	0,0	5	5.556	89,99
Apiacás	11	6.478	169,8	14	6.378	219,5	16	6.328	252,84
Araguaiana	7	3.435	203,8	4	3.451	115,9	2	3.464	57,74
Araguainha	2	1.330	150,4	2	1.305	153,3	0	1.304	0,00
Araputanga	9	14.128	63,7	7	14.374	48,7	7	14.502	48,27
Arenópolis	14	10.816	129,4	8	10.389	77,0	4	10.167	39,34
Aripuanã	69	16.992	406,1	75	18.568	403,9	49	19.373	252,93
Barão de Melgaço	0	6.801	0,0	0	6.318	0,0	0	6.073	0,00
Barra do Bugres	34	30.431	111,7	18	31.923	56,4	12	56.854	21,11
Barra do Garças	33	54.704	60,3	45	56.125	80,2	64	32.747	195,44
Bom Jesus do Araguaia	8	4.261	187,7	8	4.554	175,7	20	4.703	425,26
Brasnorte	90	11.268	798,7	20	12.057	165,9	62	12.463	497,47
Cáceres	32	86.430	37,0	17	89.055	19,1	17	90.392	18,81
Campinápolis	12	12.663	94,8	82	12.796	640,8	49	12.868	380,79
Campo Novo do Parecis	38	22.532	168,6	12	25.203	47,6	7	26.562	26,35
Campo Verde	13	21.780	59,7	20	24.267	82,4	15	25.532	58,75
Campos de Júlio	3	3.650	82,2	4	4.052	98,7	7	4.262	164,24
Canabrava do Norte	13	5.832	222,9	39	6.298	619,2	67	6.532	1025,72
Canarana	19	17.564	108,2	33	18.733	176,2	24	19.329	124,17
Carlinda	16	10.526	152,0	20	9.558	209,2	11	9.064	121,36
Castanheira	30	7.314	410,2	41	7.057	581,0	23	6.921	332,32
Chapada dos Guimarães	10	16.954	59,0	14	17.607	79,5	12	17.942	66,88
Cláudia	45	11.048	407,3	17	11.727	145,0	46	12.072	381,05
Cocalinho	0	5.373	0,0	1	5.397	18,5	0	5.402	0,00
Colíder	27	27.330	98,8	19	26.940	70,5	3	26.736	11,22
Colniza	181	12.407	1458,9	141	13.563	1039,6	278	14.148	1964,94
Comodoro	52	17.515	296,9	26	18.857	137,9	38	19.539	194,48
Confresa	25	23.737	105,3	31	26.958	115,0	35	28.597	122,39
Conquista D'Oeste	0	2.783	0,0	0	2.892	0,0	4	2.946	135,78
Cotriguaçu	78	10.919	714,4	99	12.694	779,9	81	13.393	604,79
Cuiabá	4	516.00	0,8	6	533.80	1,1	8	542.85	1,47
Curvelândia	1	4.767	21,0	1	4.902	20,4	0	4.970	0,00
Denise	0	8.573	0,0	1	9.182	10,9	3	9.488	31,62
Diamantino	16	19.623	81,5	21	20.198	104,0	18	20.486	87,86
Dom Aquino	0	8.279	0,0	3	8.202	36,6	1	8.168	12,24
Feliz Natal	85	8.298	1024,3	55	9.133	602,2	44	9.557	460,40
Figueirópolis D'Oeste	0	3.867	0,0	0	3.627	0,0	1	3.506	28,52
Gaúcha do Norte	9	5.160	174,4	18	5.463	329,5	9	5.622	160,09

General Carneiro	14	4.358	321,2	11	4.377	251,3	37	4.384	843,98
Glória D'Oeste	0	2.910	0,0	1	2.668	37,5	1	2.540	39,37
Guarantã do Norte	59	31.267	188,7	69	32.941	209,5	31	33.791	91,74
Guiratinga	5	11.791	42,4	5	11.322	44,2	23	11.084	207,51
Indiavaí	0	2.063	0,0	0	2.077	0,0	0	2.080	0,00
Itaúba	28	6.169	453,9	27	6.383	423,0	30	6.488	462,39
Itiquira	6	9.683	62,0	3	9.950	30,2	13	10.083	128,93
Jaciara	3	25.826	11,6	3	26.929	11,1	4	27.494	14,55
Jangada	2	7.909	25,3	0	8.326	0,0	4	8.544	46,82
Jauru	0	12.569	0,0	2	12.799	15,6	7	12.755	54,88
Juara	72	33.719	213,5	73	35.341	206,6	15	36.166	41,48
Juína	115	38.846	296,0	116	39.298	295,2	73	39.524	184,70
Juruena	36	6.234	577,5	87	6.216	1399,6	34	6.419	529,68
Juscimeira	11	12.513	87,9	1	12.760	7,8	8	12.889	62,07
Lambari D'Oeste	2	4.035	49,6	0	3.704	0,0	0	3.534	0,00
Lucas do Rio Verde	32	24.434	131,0	33	27.221	121,2	33	28.645	115,20
Luciára	0	2.252	0,0	0	2.122	0,0	0	2.053	0,00
Marcelândia	54	16.745	322,5	78	17.995	433,5	74	18.634	397,12
Matupá	11	11.724	93,8	20	11.960	167,2	28	12.079	231,81
Mirassol d'Oeste	12	22.679	52,9	5	22.644	22,1	1	22.623	4,42
Nobres	4	15.335	26,1	5	15.531	32,2	11	15.630	70,38
Nortelândia	12	6.101	196,7	9	5.476	164,4	1	5.157	19,39
Nossa Senhora do Livramento	12	12.809	93,7	5	13.175	38,0	1	13.360	7,49
Nova Bandeirantes	29	8.512	340,7	45	9.368	480,4	26	9.799	265,33
Nova Nazaré	2	1.987	100,7	0	1.991	0,0	0	1.997	0,00
Nova Brasilândia	12	5.135	233,7	6	4.787	125,3	2	4.607	43,41
Nova Canaã do Norte	37	11.241	329,2	17	11.092	153,3	26	11.015	236,04
Nova Guaríta	3	5.566	53,9	10	5.514	181,4	1	5.490	18,21
Nova Lacerda	13	4.452	292,0	6	4.673	128,4	11	4.790	229,65
Nova Santa Helena	9	3.471	259,3	5	3.602	138,8	5	3.672	136,17
Nova Marilândia	24	2.750	872,7	11	2.845	386,6	9	2.888	311,63
Nova Maringá	56	4.080	1372,5	56	4.151	1349,1	74	4.187	1767,38
Nova Monte Verde	13	7.955	163,4	23	8.570	268,4	13	8.881	146,38
Nova Mutum	47	16.666	282,0	24	18.328	130,9	26	19.180	135,56
Nova Olímpia	8	17.133	46,7	8	18.744	42,7	6	19.564	30,67
Nova Ubiratã	60	6.804	881,8	69	7.432	928,4	68	7.746	877,87
Nova Xavantina	27	17.560	153,8	19	17.408	109,1	12	17.331	69,24
Novo Horizonte do Norte	11	3.202	343,5	10	3.039	329,1	13	2.951	440,53
Novo Mundo	5	5.824	85,9	6	6.278	95,6	13	6.509	199,72
Novo São Joaquim	12	8.329	144,1	10	8.735	114,5	0	1.172	0,00
Paranaíta	15	9.463	158,5	18	9.034	199,2	8	8.944	89,45
Paranatinga	53	15.611	339,5	27	15.754	171,4	9	8.810	102,16
Novo Santo Antônio	1	1.179	84,8	0	1.173	0,0	46	15.833	290,53
Pedra Preta	3	14.579	20,6	3	15.108	19,9	11	15.375	71,54
Peixoto de Azevedo	38	21.671	175,3	74	19.225	384,9	39	17.980	216,91
Planalto da Serra	0	2.927	0,0	0	2.954	0,0	1	2.964	33,74
Poconé	0	31.143	0,0	3	31.348	9,6	2	31.450	6,36
Pontal do Araguaia	1	4.179	23,9	8	4.417	181,1	6	4.535	132,30
Ponte Branca	1	1.997	50,1	2	1.955	102,3	2	1.935	103,36
Pontes e Lacerda	15	40.071	37,4	9	41.632	21,6	16	42.428	37,71
Porto Alegre do Norte	5	9.085	55,0	14	9.335	150,0	10	9.463	105,67

Porto dos Gaúchos	26	6.156	422,4	32	6.422	498,3	20	6.559	304,92
Porto Esperidião	3	10.572	28,4	0	10.877	0,0	2	11.037	18,12
Porto Estrela	2	4.369	45,8	5	4.186	119,4	4	4.097	97,63
Poxoréo	14	18.470	75,8	23	17.619	130,5	49	17.186	285,12
Primavera do Leste	42	50.939	82,5	23	56.981	40,4	36	60.059	59,94
Querência	9	9.005	99,9	6	9.950	60,3	4	10.424	38,37
Reserva do Cabaçal	1	2.006	49,9	2	1.791	111,7	2	1.679	119,12
Ribeirão Cascalheira	16	7.518	212,8	6	7.632	78,6	5	7.693	64,99
Ribeirãozinho	2	2.203	90,8	7	2.323	301,3	3	2.389	125,58
Rio Branco	1	4.833	20,7	0	4.688	0,0	0	4.616	0,00
Rondolândia	3	3.813	78,7	5	4.166	120,0	11	4.344	253,22
Rondonópolis	17	160.97	10,6	15	166.82	9,0	17	169.81	10,01
Rosário Oeste	5	18.195	27,5	5	17.833	28,0	2	17.679	11,31
Santa Cruz do Xingu	1	1.283	77,9	6	1.412	424,9	1	2.776	36,02
Salto do Céu	5	3.566	140,2	0	3.081	0,0	10	1.482	674,76
Santa Rita do Trivelato	6	1.482	404,9	12	1.688	710,9	19	4.410	430,84
Santa Carmem	14	4.046	346,0	25	4.291	582,6	11	1.763	623,94
Santo Afonso	6	2.479	242,0	4	2.271	176,1	6	6.759	88,77
Santa Terezinha	15	6.538	229,4	2	6.683	29,9	5	2.162	231,27
Santo Antônio do Leste	0	2.064	0,0	6	2.166	277,0	8	2.216	361,01
Santo Antônio do Leverger	1	15.445	6,5	5	15.471	32,3	1	15.474	6,46
São Félix do Araguaia	8	9.321	85,8	19	9.259	205,2	18	9.227	195,08
São José do Povo	1	3.105	32,2	1	3.124	32,0	0	3.142	0,00
São José do Rio Claro	55	13.668	402,4	30	14.178	211,6	78	14.432	540,47
São José do Xingu	8	6.052	132,2	11	6.680	164,7	8	6.999	114,30
São José dos Quatro Marcos	0	18.753	0,0	0	18.239	0,0	0	17.981	0,00
São Pedro da Cipa	0	3.582	0,0	2	3.620	55,2	0	3.639	0,00
Sapezal	16	10.490	152,5	9	11.926	75,5	7	12.657	55,31
Serra Nova Dourada	6	1.193	502,9	5	1.295	386,1	11	1.344	818,45
Sinop	150	90.551	165,7	165	99.121	166,5	164	103.86	157,89
Sorriso	119	43.838	271,5	112	48.325	231,8	63	50.617	124,46
Tabaporã	10	14.214	70,4	18	16.054	112,1	18	16.993	105,93
Tangará da Serra	44	66.230	66,4	23	70.258	32,7	25	72.309	34,57
Tapurah	71	13.279	534,7	73	7.486	975,2	25	7.742	322,91
Terra Nova do Norte	14	12.494	112,1	24	11.848	202,6	10	11.517	86,83
Tesouro	4	2.554	156,6	7	2.239	312,6	5	2.084	239,92
Torixoréu	1	4.479	22,3	3	4.286	70,0	4	4.193	95,40
União do Sul	22	5.091	432,1	24	5.581	430,0	17	5.834	291,40
Vale de São Domingos	0	3.472	0,0	0	3.280	0,0	0	3.338	0,00
Várzea Grande	4	236.93	1,7	2	248.72	0,8	4	254.73	1,57
Vera		10.394	259,8	50	11.126	449,4	31	11.498	269,61
Vila Bela da Stsma. Trindade	274	13.867	28,8	4	14.531	27,5	4	14.860	26,92
Vila Rica	15	18.062	83,0	27	19.418	139,0	17	20.107	84,55
(Ipiranga do Norte)	-	-	-	-	-	-	0	2.234	0,00
(Itanhangá)	-	-	-	-	-	-	0	4.337	0,00
TOTAL	2868	2.697.71	185,5*	2868	2.796.54	192,3*	2751	2.857.02	189,19*
			1458,9**			1399,6**			1964,94**

* Média do coeficiente de detecção no Estado; **Coeficiente de detecção máximo no Estado

Coeficiente de detecção = casos por 100 mil habitantes

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

FOLHA DE INFORMAÇÃO

O senhor (a) tem uma doença chamada Leishmaniose que também é conhecida como “ferida brava”, “leishi” ou “pereba”, que no seu caso provocou esta(s) ferida(s) na pele. No Brasil, o medicamento fornecido pelo Ministério da Saúde para tratar esta doença é o Glucantime[®]. Entretanto, existe a necessidade de se buscar novas alternativas, uma vez que o Glucantime[®] pode causar uma série de problemas para quem o utiliza, tais como: dor nas juntas, dor no corpo, falta de apetite e, em alguns casos, problemas no coração, fígado, rins e pâncreas.

Um grupo de pesquisadores deste Serviço de Referência para Leishmanioses, autorizados pelo Ministério da Saúde/ FUNASA, está realizando um estudo para avaliar os resultados com um novo tipo de tratamento, utilizando uma vacina chamada Leishvacin[®]. Este produto já foi utilizado anteriormente em alguns lugares do Brasil, quase sempre com bons resultados e com poucos efeitos colaterais, podendo ocorrer dor leve no local da aplicação.

Para realização deste estudo é necessário fazer exames de rotina de sangue e do coração, ou seja, os mesmos exames que nós utilizamos para acompanhar os pacientes em uso do Glucantime[®]. Estes exames serão realizados antes, durante e após o término do tratamento, num total de 4 coletas de sangue e 3 exames do coração, no mínimo, para ter certeza de que não ocorreu nenhum problema pelo uso da vacina.

Este novo tratamento somente poderá ser utilizado com a sua autorização, que será dada através da assinatura de um papel que registrará o seu consentimento. Qualquer problema que o senhor (a) vier a ter será prontamente atendido no Posto Médico ou Hospital de Referência. O senhor (a) está livre para sair do grupo de tratamento quando desejar, sendo que isso não irá prejudicar o seu atendimento no posto médico ou hospital de referência.

Termo de Consentimento Pós - Informação

Eu, _____, abaixo assinado, após ser esclarecido e entender as explicações que me foram dadas, concordo voluntariamente em realizar exames de sangue e do coração, e permitir que sejam feitos exames da ferida, para poder iniciar o tratamento com o medicamento.

Concordo em ser tratado com o Glucantime® ou o Leishvacin®, usado para tratar a ferida e que está sendo avaliado por este grupo de pesquisadores e pelo Ministério da Saúde do Brasil/ FUNASA.

Sei que em qualquer momento poderei escolher abandonar o estudo sem que isto atrapalhe o meu acompanhamento médico neste serviço.

Paciente ou Responsável: _____

Registro do Paciente: _____

Data: _____

Assinatura do Pesquisador: _____

Local e telefone para contatar o pesquisador, em caso de necessidade:

- Local:
- Telefone:

ANEXO 3**FICHA CLÍNICA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JÚLIO MULLER
 Protocolo de atendimento de pacientes com LC, incluídos no ensaio clínico
AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO LEISHVACIN® NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

ENTREVISTADOR: _____ Data ____/____/____

I - IDENTIFICAÇÃO E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS (1-12)		
N.º de ordem _____ (o mesmo da ordem de entrada no banco de dados) Registro: _____		
Nome: _____		
Endereço: _____		
1. Município Res: _____ 2. UF1 _____ Fone _____		
3. Idade: _____ anos		
4. Sexo:	() 1 Masculino () 2 Feminino	
5. Cor/Etnia:	() 1. branca () 3. negra () 5. indígena () 2. parda () 4. amarela	
6. Relação da infecção com:	() 1 trabalho () 2 lazer () 3 outros	
7. Ocupação à época do contágio:	() 1 lavrador () 5 sitiante/fazendeiro () 2 vaqueiro () 6 lavoura/mata (nível médio) () 3 garimpeiro () 7 lavoura/mata (nível superior) () 4 desmatador () 8 outros _____	
8. Profissão principal:	_____	
Naturalidade:	Cidade: _____ UF: _____	
9. Residência à época do contágio	() 1 Urbana () 2 Rural () 3 Assentamento	
10. Provável local de contágio:	() 1 fazenda/sítio () 2 gleba-assentamento () 3 outro _____	
11. Município do contágio	_____ 12. UF2 _____	
II.b DADOS CLÍNICOS DA(S) LESÃO(ÕES) (13-24)		5
13. Tempo de início dos sintomas	_____ meses	
14. ÚLCERA:	() 1 sim () 2 não () 99 NA	
Características 15. Borda	() 1 elevada () 2 plana () 99 NA	
16. Sensibilidade	() 1 dolorosa () 2 indolor () 99 NA	
17. Fundo	() 1 limpo, granuloso () 2 com exsudato () 99 NA	
18. OUTROS TIPOS DE LESÃO	() 1 papular () 2 verrucosa () 3 vegetante () 4 placa () 99 NA	
19. Número de lesões (em negrito)	() 1.1 () 2.2 () 3.3-4 () 4.5-6	

20. Localização das lesões (assinalar quantas necessárias)	() 1Face () 2Orelha () 3Pescoço	() 4Tronco () 5MMSS () 6MMII	
21. Tamanho da lesão (se lesões múltiplas, detalhar as 3 maiores)	1. ____x____cm 2. ____x____cm 3. ____x____cm		

LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES:

Um X para cada lesão

22. Alterações associadas	() 1linfadenite/linfangite () 2pápulas satélites	
23. Forma clínica	() 1 ulcerada () 4 verrucosa () 7 infiltrativa () 2 úlcero-crostosa () 5 vegetante () 8 outra_____ () 3 úlcero-vegetante () 6 impetigóide	
6 24. Curativos no domicílio	7 () 1uso de plantas () 2 uso de fármacos () 99não utiliza	

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO (25-35)

25. Intradermorreação (IRM) Inoculação: ____/____/____ Leitura: ____/____/____	1. () < 5 mm de diâmetro 2. () 5-15 mm de diâmetro 3. () > 15 mm de diâmetro 99.() não realizada Diâmetro____mm	
26. Flictenula	1. () sim 2. () não 9. () Ignorado	
27. Raspado	1. () pos. 2. () neg. 99.() NR	
28. Aspirado	1. () pos. 2. () neg. 99.() NR	
29. <i>Imprint</i>	1. () pos. 2. () neg. 99.() NR	
30. Cultura de raspado	1. () pos. 2. () neg. 99.() NR	
31. Cultura de aspirado	1. () pos. 2. () neg. 99.() NR	

32. Cultura de fragmento	1. () pos. 2. () neg. 99.() NR	
33. Histopatológico	1. () pos. 2. () sugestivo 3. () inesp. 99.() NR	
34. Material biológico armazenado em criotubo	1. () fragmento Data ___/___/___ 2. () cultivo Data ___/___/___	
35. Espécie identificada	1Isoenzimas _____ 2PCR _____	
TRATAMENTO (36-43)		
36. Data de início:	em ___/___/___	
37. Peso do paciente	_____ kg	

LEISHVACIN®		
38. Prescrição	1.() sim	2.() não
GLUCANTIME®		
Quantidade/dia	_____ ml/ dia EV	
39. Dose	_____ mg/kg/dia (o mais próximo de 15 mg/Kg/dia)	
40. Efeitos adversos Data: ___/___/___ D___ (E) Relato espontâneo (Q) Se questionado	1 () artralgia 2 () mialgia 3 () cefaléia 4 () febre 5 () dor aplicação 6 () eritema aplic. 7 () prurido 8 () insônia/sonol.	9 () fraqueza 10 () ↑↓apetite 11 () pirose 12 () náuseas 13 () vômitos 14 () plenitude 15 () ↓ ↑peso 16 () edema
41. Efeitos adversos Data: ___/___/___ D___ (E) Relato espontâneo (Q) Se questionado	17 () tontura 18 () nervosismo 19 () flebite 20 () palpitação 21 () h. zoster 22 () dor abdom. 23 () insuf. renal 24 () outro_____	

42. Efeitos adversos Data: __/__/____ D____ E Relato espontâneo Q Se questionado	1 () artralgia 2 () mialgia 3 () cefaléia 4 () febre 5 () dor aplicação 6 () eritema aplic. 7 () prurido 8 () insônia/sonol.	9 () fraqueza 10 () ↑↓apetite 11 () pirose 12 () náuseas 13 () vômitos 14 () plenitude 15 () ↓ ↑peso 16 () edema	17 () tontura 18 () nervosismo 19 () flebite 20 () palpitação 21 () h. zoster 22 () dor abdom. 23 () insuf. renal 24 () outro_____	
Efeitos adversos, se presentes, nos retornos de 80°. e 110°. dias Dia ____ (__/__/____) _____ Dia ____ (__/__/____) _____				
43. Série concluída	1 () sim, em __/__/____	2 () não	9 () ignorado	
RESPOSTA AO TRATAMENTO (44-47)				
44. Fim da série D____	() 1 cura clínica () 2 melhora () 3 sem melhora () 9 ignorado	() 2 melhora () 9 ignorado	LESÃO:	
45. 1 mês após D____	() 1 cura clínica () 2 melhora () 3 sem melhora () 9 ignorado	() 2 melhora () 9 ignorado	LESÃO:	
46. 2 meses após D____	() 1 cura clínica () 2 melhora () 3 sem melhora () 9 ignorado	() 2 melhora () 9 ignorado	LESÃO:	
47. 3 meses após D____	() 1 cura clínica () 2 melhora () 3 sem melhora () 9 ignorado	() 2 melhora () 9 ignorado	LESÃO:	
FALHA TERAPÊUTICA (48-65)				
Outra série				
48. Data de início:	____/____/____			
49. Justificativa:	() 1 cicatrização incompleta após 3 meses () 2 piora clínica antes dos 3 meses			
50. Esquema terapêutico	() Antimoniato de Meglumina () Outro			

I. BIOQUÍMICA

DATA	51Uréia	52Creat	53TGO	54TGP	55 F. Alc	56Amilase	
1 Dia 0	1()	1()	1()	1()	1()	1()	
2 Dia 10	2()	2()	2()	2()	2()	2()	
3 Dia 20	3()	3()	3()	3()	3()	3()	
4 Dia 50	4()	4()	4()	4()	4()	4()	

II. ECG

Exame	Realizado	Resultado	
Dia 0	Sim () Não ()	Ritmo ()R ()I FC Eixo	T ()SA ()A ()P ()I QTc ____ ST_____
Dia 10	Sim () Não ()	Ritmo ()R ()I FC Eixo	T ()SA ()A ()P ()I QTc ____ ST_____
Dia 20	Sim () Não ()	Ritmo ()R ()I FC Eixo	T ()SA ()A ()P ()I QTc ____ ST_____
Dia 50	Sim () Não ()	Ritmo ()R ()I FC Eixo	T ()SA ()A ()P ()I QTc ____ ST_____

*SA- sem alterações; A- achatada; P- plana; I- invertida

III. HEMOGRAMA

Exame / Data	Dia 0 _/_/_	Dia 10 _/_/_	Dia 20 _/_/_	Dia 50 _/_/_	_/_/_	_/_/_
Hb	1()	2()	3()	4()		
Htc						
VCM						
CHCM						
58Leucócitos	1()	2()	3()	4()		
59Neutrófilos	1()	2()	3()	4()		
Linfócitos						
60Eosinófilos	1()	2()	3()	4()		
Monócitos						
61Plaquetas	1()	2()	3()	4()		
Reticulócitos						
Outros						

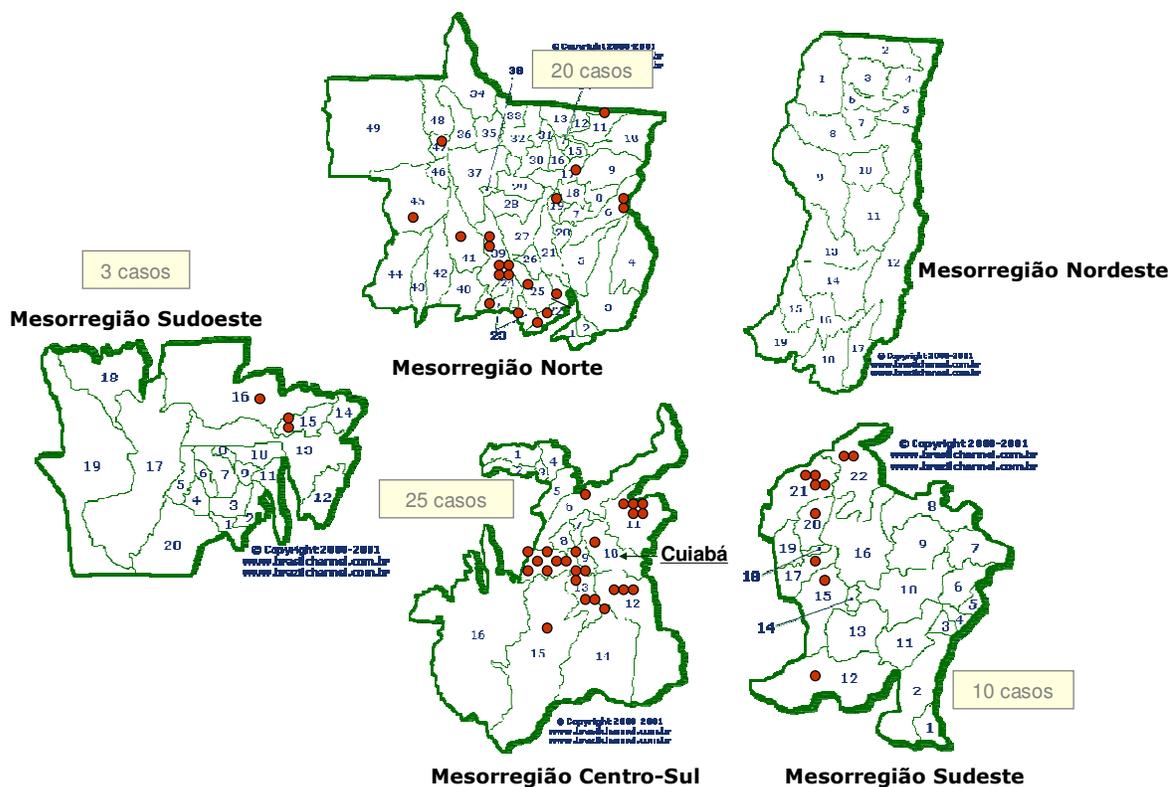
ANEXO 4 - Cronograma de Atividades no Cadastramento e Seguimento dos Pacientes

<i>TRATAMENTO</i>			<i>PÓS - TRATAMENTO</i>		
			<i>PRIMEIRO MÊS</i>	<i>SEGUNDO MÊS</i>	<i>TERCEIRO MÊS</i>
<i>DIA 0</i>	<i>DIA 10</i>	<i>DIA 20</i>	<i>DIA 50</i>	<i>DIA 80</i>	<i>DIA 110</i>
<ul style="list-style-type: none"> * Cadastramento do paciente * Preenchimento da ficha clínica * Limpeza, medida, descrição e fotografia da lesão * Leitura da IRM * Anestesia da lesão * Análise de resultados de procedimentos: Esfregaço, Biópsia * Anotação de resultados de exames de laboratório e ECG (<i>baseline</i>) * Início do tratamento 	<ul style="list-style-type: none"> * Controle do tratamento e da evolução clínica * Avaliação dos efeitos colaterais * Limpeza, medida e descrição da lesão * ECG * Coleta de sangue para exames de laboratório 	<ul style="list-style-type: none"> * Controle do tratamento e da evolução clínica * Avaliação dos efeitos colaterais * Limpeza, medida e descrição da lesão * ECG * Coleta de sangue para exames de laboratório 	<ul style="list-style-type: none"> * Avaliação da evolução clínica * Coleta de sangue para exames de laboratório em caso de alteração anterior. 	<ul style="list-style-type: none"> * Avaliação da evolução clínica 	<ul style="list-style-type: none"> * Avaliação da evolução clínica

ANEXO 5



Mapa do Estado de Mato Grosso, com divisão por mesorregiões.



Fonte www.brazilchannel.com.br

Mesorregiões de Mato Grosso, com representação de procedência dos pacientes do estudo.

ANEXO 5

Relação dos municípios do Estado de Mato Grosso dos quais procederam 58 pacientes incluídos no estudo, com a respectiva frequência de casos e coeficiente de incidência de leishmaniose tegumentar. 2004-2006.

Municípios	Número de pacientes incluídos no estudo		Coeficientes de detecção ¹ de leishmaniose tegumentar		
	n	%	2004	2005	2006
Brasnorte	1	1,72	558,7	798,7	497,5
Cáceres	1	1,72	37,0	19,1	18,8
Campo Verde	4	6,89	59,7	82,4	58,8
Chapada dos Guimarães	5	8,62	59,0	79,5	66,9
Cuiabá	1	1,72	0,8	1,1	1,5
Diamantino	2	3,45	81,5	104,0	87,9
Dom Aquino	1	1,72	-	36,6	12,2
Feliz Natal	2	3,45	1024,3	602,2	460,4
Itaúba	1	1,72	453,9	423,0	462,4
Itiquira	1	1,72	62,0	30,2	128,9
Juína	1	1,72	296,0	295,2	184,7
Juruena	1	1,72	577,5	1399,6	529,7
Juscimeira	1	1,72	87,9	7,8	62,1
Matupá	1	1,72	93,8	167,2	231,8
Nobres	2	3,45	26,1	32,2	70,4
N. Sra do Livramento	13	22,41	93,7	38,0	7,5
Nova Maringá	2	3,45	1372,5	1379,1	1767,4
Nova Mutum	1	1,72	282,0	130,9	135,6
Poconé	1	1,72	-	9,6	6,4
Primavera do Leste	2	3,45	82,5	40,4	59,9
Rondonópolis	1	1,72	10,6	9,0	10,0
Rosário Oeste	1	1,72	27,5	28,0	11,3
Santa Rita do Trivelato	1	1,72	404,9	710,9	623,9
São Jose do Rio Claro	4	6,89	402,4	211,6	540,5
Sinop	1	1,72	165,7	166,5	157,9
Tangara da Serra	2	3,45	66,4	32,7	34,6
Várzea Grande	1	1,72	1,7	0,8	1,6
Total²	58	100,00	-	-	-

¹ Casos incidentes por 100 mil hab.

² Total de casos de MT; 7 pacientes adquiriram a infecção em outro Estado; 1 paciente referiu infecção MT, mas não identificou o município.

ANEXO 6

Relação das cepas de *Leishmania* identificadas por PCR-RLFP, por perfil de resposta P1 ou P2, segundo a enzima de restrição ECOR1 ou SAU 3A, por paciente do estudo identificado segundo seu número de ordem no projeto. Total de 67 amostras amplificadas.

NÚMERO DE ORDEM	PCR-RLFP	ENZIMAS	
		ECOR1	SAU 3A
01-	Negativo	-	-
02-	Positivo	P2	P1
03-	Positivo	P2	P1
04-	Positivo	P2	P1
05-	Positivo	P2	P1
06-	Positivo	P2	P1
07-	Positivo	P2	P1
08-	Positivo	P1	P1
09-	Positivo	P2	P1
10-	Positivo	P2	P1
11-	Negativo	-	-
12-	Negativo	-	-
13-	Positivo	P2	P1
14-	Positivo	P2	P1
15-	Positivo	P2	P1
16-	Positivo	P2	P1
17-	Positivo	P2	P1
18-	Positivo	P2	P1
19-	Positivo	P2	P1
20-	Positivo	P2	P1
21-	Positivo	P2	P1
22-	Positivo	P2	P1
23-	Positivo	P2	P1
24-	Positivo	P2	P1
25-	Positivo	P2	P1
26-	Positivo	P2	P1
27-	Positivo	P2	P1
28-	Positivo	P2	P1
29-	Positivo	P2	P1
30-	Positivo	P2	P1
31-	Positivo	P2	P1
32-	Positivo	P2	P1
33-	Positivo	P2	P1
34-	Positivo	P2	P1
35-	Positivo	P2	P1
36-	Positivo	P2	P1
37-	Negativo	-	-
38-	Positivo	P2	P1
39-	Positivo	P2	P1
40-	Positivo	P2	P1
41-	Positivo	P2	P1

ANEXO 6

Relação das cepas de *Leishmania* identificadas por PCR-RLFP, por perfil de resposta P1 ou P2, segundo a enzima de restrição ECOR1 ou SAU 3A, por paciente do estudo identificado segundo seu número de ordem no projeto. Total de 67 amostras amplificadas.

NÚMERO DE ORDEM	PCR-RLFP	ENZIMAS	
42-	Positivo	P2	P1
43-	Positivo	P2	P1
44-	Positivo	P2	P1
45-	Positivo	P2	P1
46-	Positivo	P2	P1
47-	Positivo	P3	P2
48-	Positivo	P2	P1
49-	Positivo	P2	P1
50-	Positivo	P2	P1
51-	Positivo	P2	P1
52-	Positivo	P2	P1
53-	Positivo	P2	P1
54-	Positivo	P2	P1
55-	Positivo	P2	P1
56-	Positivo	P2	P1
57-	Positivo	P2	P1
58-	Positivo	P2	P1
59-	Positivo	P2	P1
60-	Positivo	P2	P1
61-	Positivo	P2	P1
62-	Positivo	P2	P1
63-	Positivo	P2	P1
64-	Positivo	P2	P1
65-	Negativo	-	-
66-	Positivo	P2	P1
67-	Positivo	P2	P1

67 amostras amplificadas: 62 positivas (inclui as 4 perdas e as 3 exclusões) e 5 negativas

Perfis: 60 P2/P1, 1 P1/P1, 1 P2/P3