

Universidade Federal do Maranhão
Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa, Pós-Graduação e Internacionalização
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente

GUSTAVO DE ALMEIDA SANTOS

Aspectos clínicos, falha de tratamento e recidivas na Leishmaniose Visceral: uma abordagem bibliográfica e experimental para relacionar esses fatores com a tolerância medicamentosa de isolados clínicos de *Leishmania infantum*

SÃO LUÍS

2022

GUSTAVO DE ALMEIDA SANTOS

Aspectos clínicos, falha de tratamento e recidivas na Leishmaniose visceral: uma abordagem bibliográfica e experimental para relacionar esses fatores com a tolerância medicamentosa de isolados clínicos de *Leishmania infantum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Saúde das Populações.
Linha de Pesquisa: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Mayara Ingrid Sousa Lima

SÃO LUÍS

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

SANTOS, GUSTAVO DE ALMEIDA.

Aspectos clínicos, falha de tratamento e recidivas na Leishmaniose Visceral : uma abordagem bibliográfica e experimental para relacionar esses fatores com a tolerância medicamentosa de isolados clínicos de *Leishmania infantum* / GUSTAVO DE ALMEIDA SANTOS. - 2022. 119 p.

Orientador(a): Mayara Ingrid Sousa Lima.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUÍS, 2022.

1. Anfotericina B. 2. Antimônio. 3. Sensibilidade in vitro. I. Lima, Mayara Ingrid Sousa. II. Título.

GUSTAVO DE ALMEIDA SANTOS

Aspectos clínicos, falha de tratamento e recidivas na Leishmaniose visceral: uma abordagem bibliográfica e experimental para relacionar esses fatores com a tolerância medicamentosa de isolados clínicos de *Leishmania infantum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Saúde das Populações.
Linha de Pesquisa: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Mayara Ingrid Sousa Lima

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mayara Ingrid Sousa Lima (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho
Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Flavia Maria Mendonça do Amaral
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo
(Suplente) Universidade Federal do Maranhão

Eni maa je eyin ori àpàta, ki nwo enu àké

“Quem deseja comer o ovo da ave rara, cujo ninho está no topo da montanha, não pode medir esforços para encontrá-lo” (Provérbio Yoruba)

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, por me oportunizar a vida e capacidade de correr atrás dos meus sonhos e objetivos de vida, além de me proporcionar a fé em momentos aos quais a mesma era necessária para continuar a jornada.

À Universidade Federal do Maranhão por me possibilitar realizar o sonho do curso superior e a realização da Pós-Graduação, por fornecer e fomentar a educação que moldou as bases e formação do profissional que serei no futuro, além de me proporcionar o ensino com qualidade e segurança, transformando a perspectiva e a visão de mundo ao qual mantenho hoje.

Agradeço também ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular - LabGeM, no qual obtive a possibilidade de aprendizagens imensuráveis e onde passei a maior parte do tempo do meu Mestrado. Assim como o Grupo de Estudos em Biotecnologia e Genética -BioGen o qual me forneceu toda uma base de conhecimento a respeito do caminho científico, além de me oportunizar aprendizado como experiência de vida e que serão lembradas para sempre.

À minha Orientadora Mayara Ingrid Sousa Lima por ser uma fonte de inspiração, me instigando a explorar ao máximo meus potenciais e buscar em todo momento me desenvolver como pessoa, como profissional, como ser humano, capaz de contribuir para a sociedade de forma geral.

Aos professores da Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente por me fornecerem o conhecimento e vivências que foram imprescindíveis para minha formação profissional, habilidades técnicas e desenvolvimento pessoal.

Aos meus pais Valdir Silva dos Santos e Maria de Nazaré de Almeida Silva, por me garantirem experienciar a vida com o máximo de intensidade e vigor, por me guardarem em momentos difícil, sendo sempre o ombro amigo, o porto seguro, a bússola que guia meus caminhos e que me levar a alcançar meus maiores sonhos, assim como pela capacidade de acreditar no meu potencial até mesmo quando eu tinha dúvidas, e por todo o cuidado, amor e carinho que proporcionou montar o meu caráter e me fez ser e ter ciência de quem sou. Serão meus eternos heróis, eternos amigos e a razão de permanecer sempre com a cabeça erguida em busca de ser o meu melhor.

Aos meus companheiros do LabGeM por me proporcionarem momentos especiais no grupo e me fortalecerem enquanto profissional com muitas qualidades técnicas e científicas, além de contribuírem para complementar minhas habilidades como cientista.

Aos meus amigos, Matheus Aquino de Assis Silva, Natã Silva dos Santos, Aline Santana Figueredo, Paula do Santos Brito e Douglas Moraes Campos, aos quais tive a oportunidade de conhecer dentro da Enfermagem e são amigos que levarei para vida, sendo responsáveis por grande parte do ser que sou hoje e por muitas vezes contribuírem para a minha profissionalização, sendo motivo de inspiração e exemplo. Gostaria de agradecer em especial a Juliana Mendes Sousa, que me acompanhou nessa jornada e me ensinou quase tudo que eu sei hoje sobre técnicas laboratoriais, genéticas e moleculares, além de contribuir em toda a execução da minha dissertação, sendo uma referência de profissional, cientista e pessoa.

A Santinha que desempenhou um excelente trabalho e cuidou de todos os alunos tantas vezes dentro do laboratório, garantindo que nossas jornadas de trabalho as mais agradáveis e eficazes possível, contribuindo de maneira direta e indireta na realização de todas as pesquisas realizadas no LabGeM e sendo a melhor profissional de todos.

Por fim, agradeço todos os responsáveis por me possibilitar e permitirem conseguir ingressar e finalizar minha Pós-Graduação em Saúde e Ambiente. Cada mínimo detalhe nessa pesquisa só foi possível porque muitos me ajudaram, tudo que eu sou hoje e cada conquista que obtenho é fruto de esforços de muitos, de todos. Tudo que nós temos no mundo somos nós e é para cada um de vocês que eu dedico mais essa conquista.

RESUMO

As Leishmanioses são um grupo de doenças negligenciadas que acometem muitos países em subdesenvolvimento ou desenvolvimento. As principais apresentações clínicas da doença são a forma visceral e tegumentar, causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, o qual abrange mais de 20 espécies causadoras da doença. A utilização de fármacos é o principal método empregado para o controle e tratamento das doenças, contudo, essa metodologia encontra obstáculos, dada quantidade limitada de fármacos disponíveis no mercado, além de problemas frequentemente abordados na literatura, como a possibilidade da presença de parasitos resistentes e a ocorrência de Falhas de Tratamento e Recidivas Clínicas como fatores que dificultam um desfecho clínico favorável. Nesse sentido, este trabalho propôs no Capítulo I uma revisão de literatura que entendeu os processos envolvidos nos casos de Falhas de Tratamento (FT) e Recidivas Clínicas (RC) nas duas apresentações clínicas da Leishmaniose no mundo. A metodologia se baseou na obtenção de artigos científicos publicados em bases de dados entre 1990 e 2021 em português, inglês e espanhol relacionando casos de Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Visceral (LV) em humanos com FT e RC, incluindo tanto dados epidemiológicos quanto estudos experimentais. Nos resultados alcançados, é possível observar que FT e RC são multifatoriais, com um conjunto de condições que envolve principalmente a capacidade plástica do parasito em resistir e esquivar a ação dos fármacos e fatores relacionados à competência imunológica do hospedeiro, sendo o quadro clínico de FT e RC decorrentes dessa combinação ou da apresentação dessas circunstâncias isoladas. No Capítulo II, foi realizada uma correlação dos dados clínicos/laboratoriais de pacientes com Leishmaniose Visceral e a sensibilidade de isolados clínicos de *Leishmania (Leishmania) infantum* frente ao Antimônio Trivalente e a Anfotericina B. O método utilizado baseia-se na coleta e cultivo de parasitos obtidos de isolados clínicos, ensaios de sensibilidade *in vitro* das formas promastigotas frente ao Antimônio Trivalente e Anfotericina B para obtenção da EC50 e análises de correlação das variáveis clínicas dos pacientes com os dados experimentais. Foi obtido o EC50 dos isolados clínicos coletados, comparados com o resultado da cepa padrão, classificados como susceptíveis ou resistentes e correlacionados com os achados clínicos e laboratoriais dos pacientes. Não foi encontrada uma associação positiva entre a presença do parasito resistente e o acometimento com sinais e sintomas clínicos mais severos e/ou as ocorrências de FT ou RC, entretanto, observou-se uma relação entre a presença de doenças imunossupressoras e os casos RC. Além disso, também encontramos uma correlação direta entre a sensibilidade do parasito para ambos os fármacos, indicando, dessa maneira, que existe uma tendência à resistência cruzada entre os isolados clínicos analisados. Dessa forma, os ensaios experimentais indicam que para o *Leishmania (L.) infantum* a sensibilidade do parasito aos fármacos não parece ser a causa mais direta para o desfecho clínico de FT ou RC, reforçando os achados da revisão de literatura que apontam esses fenômenos como processos multifatoriais complexos, que envolvem tanto aspectos do parasito (não somente a sensibilidade *in vitro*) quanto a resposta do hospedeiro.

Palavras-chaves: Sensibilidade *in vitro*. Antimônio. Anfotericina B

ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of neglected diseases that affect many underdeveloped or developing countries. The main clinical presentations of the disease are the visceral and tegumentary forms, caused by parasites of the *Leishmania* genus, which includes more than 20 species that cause the disease. The use of drugs is the main method used for the control and treatment of diseases, however, this methodology encounters obstacles, given the limited amount of drugs available on the market, in addition to problems frequently addressed in the literature, such as the possibility of the presence of resistant parasites and the occurrence of Treatment Failures and Clinical Relapses as factors that hinder a favorable clinical outcome. In this sense, this work proposed in Chapter I a literature review that understood the processes involved in the cases of Treatment Failures (TF) and Clinical Relapses (CR) in the two clinical presentations of Leishmaniasis in the world. The methodology was based on obtaining scientific articles published in databases between 1990 and 2021 in Portuguese, English and Spanish relating cases of Cutaneous Leishmaniasis (CL) and Visceral Leishmaniasis (VL) in humans with FT and CR, including both epidemiological and experimental studies. In the results achieved, it is possible to observe that TF and RC are multifactorial, with a set of conditions that mainly involves the plastic ability of the parasite to resist and evade the action of drugs and factors related to the immunological competence of the host, being the clinical picture of TF and CR arising from this combination or the presentation of these isolated circumstances. In Chapter II, a correlation was performed between clinical/laboratory data from patients with Visceral Leishmaniasis and the sensitivity of clinical isolates of *Leishmania (Leishmania) infantum* against Trivalent Antimony and Amphotericin B. The method used is based on the collection and cultivation of parasites obtained from clinical isolates, *in vitro* sensitivity assays of the promastigote forms against Trivalent Antimony and Amphotericin B to obtain the EC50 and correlation analysis of the clinical variables of the patients with the experimental data. The EC50 of the collected clinical isolates was obtained, compared with the result of the standard strain, classified as susceptible or resistant and correlated with the clinical and laboratory findings of the patients. A positive association was not found between the presence of the resistant parasite and the involvement with more severe clinical signs and symptoms and/or the occurrences of TF or CR, however, a relationship was observed between the presence of immunosuppressive diseases and CR cases. In addition, we also found a direct correlation between the sensitivity of the parasite to both drugs, thus indicating that there is a tendency towards cross-resistance between the clinical isolates analyzed. Thus, experimental trials indicate that for *Leishmania (L.) infantum*, the parasite's sensitivity to drugs does not seem to be the most direct cause for the clinical outcome of TF or CR, reinforcing the findings of the literature review that point to these phenomena as complex multifactorial processes, which involve both aspects of the parasite (not only *in vitro* sensitivity) and the host response.

Keywords: *in vitro* sensitivity. Antimony. Amphotericin B

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

14-3-3	Proteínas reguladoras expressas em todas as células eucarióticas
ABC MRPA	Transportadores ABC (ATP-binding cassette)
AI	Índice de Atividade
ALT/TGP	Alanina Aminotransferase/Transaminase Pirúvica
AM	Antimoniato de Meglumina
AMA	Amastigotas
AmB	Anfotericina B
AmBisome	Anfotericina B
AQP1	Aquaporina 1
ARGG	Síntese de Argininosuccinato
AST/TGO	Aspartato Aminotransferase/Transaminase Oxalacética
Bil. Direta	Bilirrubina Total
Bil. Total	Bilirrubina Total
BOD	Demanda de oxigênio bioquímico
CI	Isolado Clínico
DeCS	Descritores em Ciências da Saúde
EC50	Concentração Efetiva que inibe a concentração celular em 50%
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FT ou TF	Falha de Tratamento/Therapeutic Failure
GLI	Glibenclamida
GLU	Antimoniato de Meglumina (Glucontime [®])
GSH1	Glutationa 1
H4	Histona 4
HaeIII	Enzima de restrição
IFN- γ /IL-10	Interferon-gama/Interleucina 10
ITS1	Espaçador transcrito interno 1
KALA-CAL	Calculadora de Severidade do Calazar
L-AmB	Anfotericina B Lipossomal
LCD	Leishmaniose Tegumentar Difusa
LRV/LRV1/LRV2	Leishmania RNA vírus/Leishmania RNA vírus 1/Leishmania RNA vírus 2

LV ou VL	Leishmaniose Visceral
MAPK	Proteína quinase 1 ativada por mitógeno
MCL	Leishmaniose Mucocutânea
MIL	Miltefosina
MSL	<i>Locus</i> de Sensibilidade da Miltefosina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
N. I.	Não Informado
NK	Natural Killer
PAR	Paramomicina
PCA	Análise do componente principal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PENT	Pentamidina
PKDL	Leishmaniose dérmica pós-calazar
PRO	Promastigotas
PROSPERO	Registro Internacional Prospectivo de Revisões Sistemáticas
RC ou CR	Recidiva Clínica
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
RIFI	Imunofluorescência reativa
RS	Cepa de Referência
Sb ^{III}	Antimônio trivalente
Sb ^V	Antimônio Pentavalente
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SS	Estibogluconato de Sódio (Pentostam®)
TF/RC	Falha de Tratamento e/ou Recidiva Clínica
TGFβ	Fator de Crescimento Transformador-β
Th1	Células produtoras de Interferon gama 1
Transportadores ABC	Cassete de ligação de ATP
CL	Leishmaniose Cutânea
VL/HIV	Leishmaniose Visceral e o Vírus da Imunodeficiência Humana

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I:

- Figura 1:** Fluxograma de pesquisas realizadas seguindo o método Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA)..... 54
- Figura 2:** Diagrama esquemático da metodologia utilizada para pesquisar e categorizar os artigos encontrados..... 55
- Figura 3:** Gráfico com dados coletados de todos os artigos classificados como Relatos de Caso 56

CAPÍTULO II:

- Figura 1.** Identificação e caracterização dos isolados clínicos de pacientes com Leishmaniose Visceral. M: Marcador molecular; *Li*: Controle de *Leishmania infantum*; *La*: Controle de *Leishmania amazonenses*; *Lb*: Controle de *Leishmania braziliensis*; 06 a 93: Isolados Clínicos e CN: Controle Negativo. 94
- Figura 2.** Matriz de correlação linear entre os valores dos testes de sensibilidade e o escore Kala-cal clínico. Variação das cores do mapa de calor (*heat map*) representa o coeficiente de correlação..... 95
- Figura 3.** Análise comparativa do escore Kala-cal clínico entre os isolados clínicos categorizados como susceptíveis e resistentes ao Antimônio Trivalente. A linha representa a mediana..... 96
- Figura 4.** Análise de correlação entre idade dos pacientes dos quais foram coletados os isolados clínicos e a sensibilidade desses isolados clínicos ao Antimônio Trivalente e a Anfotericina B. 97
- Figura 5.** Matriz de correlação linear entre os valores dos testes de sensibilidade ao Antimônio Trivalente e a Anfotericina B e as medidas séricas coletadas. Variação das cores do mapa de calor (*Heat map*) representa o coeficiente de correlação. 98

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I:

- Tabela 1.** Conceitos de Não Resposta, Recidiva Clínica e Falha de Tratamento de acordo com os manuais da Organização Mundial da Saúde 57
- Tabela 2.** Dados coletados dos artigos categorizados como "Experimentais com foco no parasito" 59
- Tabela 3.** Dados coletados dos artigos categorizados como "Estudos populacionais com foco no hospedeiro" 62

CAPÍTULO II:

- Tabela 1.** Perfil demográfico e clínico dos pacientes com Leishmaniose Visceral incluídos no presente estudo. 99
- Tabela 2.** Sinais e sintomas clínicos apresentados pelos pacientes com Leishmaniose Visceral incluídos na amostra do presente estudo. 101
- Tabela 3.** Dados dos marcadores séricos dos pacientes incluídos na amostra..... 102
- Tabela 4.** Resultado do teste de sensibilidade das formas promastigotas ao Antimônio Trivalente e a Anfotericina B, e o cálculo do escore Kala-cal Clínico nos casos incluídos no estudo..... 103
- Tabela 5.** Análise de correlação linear entre os valores de sensibilidade das formas promastigotas ao Antimônio Trivalente e a Anfotericina B e do escore Kala-cal clínico. 105
- Tabela 6.** Análise de correlação linear entre os valores de sensibilidade das formas promastigotas ao Antimônio Trivalente e a Anfotericina B e das medidas séricas. 106
- Tabela 7.** Análise comparativa dos valores do teste de sensibilidade das formas promastigotas ao Antimônio Trivalente e a Anfotericina B de acordo com os desfechos Falha de Tratamento e Recidiva Clínica na Leishmaniose Visceral. 108

Tabela 8. Análise de regressão das variáveis clínicas sobre a sensibilidade das formas promastigotas ao Antimônio Trivalente ajustada para idade.....	109
Tabela 9. Análise de regressão das variáveis clínicas sobre a sensibilidade das formas promastigotas a Anfotericina B ajustada para idade.	110
Tabela 10. Associação dos fatores gerais, clínicos e laboratoriais com os desfechos Falha de Tratamento e Recidiva Clínica.	111

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	16
JUSTIFICATIVA	17
OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Especificos	18
CAPÍTULO I	19
Resumo	20
Introdução	20
Metodologia.....	22
Protocolo de revisão de literatura	22
Fontes de dados e estratégias de pesquisa	22
Critérios de inclusão e exclusão.....	22
Processo de Seleção	22
Extração dos dados	23
Análises.....	23
Resultados e Discussão	23
Compreendendo as variações dos conceitos de Falha no Tratamento e Recidivas Clínicas em Leishmaniose	23
Aspectos multifatoriais das Falhas de Tratamento e Recidiva Clínicas nas Leishmaniose..	25
Relatos de caso.....	25
Dados experimentais com foco no parasito	29
Dados populacionais com foco no hospedeiro.....	33
Considerações Finais	39
Fomento	42
Referências	42
CAPÍTULO II.....	65
Resumo:	66
1. Introdução.....	67
2. Metodologia.....	68
2.1 Desenho do estudo e amostras biológicas.....	68
2.2 Classificação dos pacientes.....	69
2.3 Isolamento do parasito a partir do aspirado de medula óssea.....	70
2.4 Informações clínico-epidemiológicas dos pacientes.....	70
2.5 Ensaio laboratoriais	71
2.5.1 Fármacos	71
2.5.2 Identificação do parasito	71
2.5.3 Atividade de droga contra formas promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	71
2.5.4 Critérios para definição de isolado susceptível ou resistente	72
2.6 Análise estatística	72
3. Resultados	73
3.1 Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes com Leishmaniose Visceral de origem dos isolados clínicos.....	73
3.2 Sensibilidade <i>in vitro</i> dos isolados clínicos de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	74
3.2.1 Identificação e Caracterização dos Isolados Clínicos	74
3.2.2 Sensibilidade dos isolados clínicos (promastigotas)	74
3.3 Correlação dos dados clínicos e sensibilidade <i>in vitro</i> dos isolados clínicos	74
3.1 Promastigotas	74
4. Discussão	76

4.1 A sensibilidade do parasito aos fármacos tem importância no quadro clínico do paciente com Leishmaniose Visceral?	77
4.2 A sensibilidade do parasito aos fármacos tem importância na ocorrência da Falha de Tratamento e na Recidiva Clínica?	79
4.3 Implicações para o controle e tratamento da Leishmaniose Visceral	83
5. Conclusões	84
Fomento	85
Referências	85
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
PERSPECTIVAS.....	113
ANEXOS	115
ANEXO - I.....	115
ANEXO - II	118

INTRODUÇÃO GERAL

Essa dissertação tem como tema as Leishmanioses, doenças caracterizadas como um problema de saúde pública em muitos países, onde uma parte considerável dos doentes sofrem com problemas recorrentes como a Falha de Tratamento (FT) e Recidiva Clínica (RC), fenômenos complexos e que envolvem em suas ocorrências várias condições. A pesquisa conta com dois capítulos centrais que buscam entender no primeiro caso quais circunstâncias estão envolvidas no acometimento da FT e RC, aspirando compreender principalmente a colaboração do parasito e do hospedeiro nessas ocorrências. Já no segundo capítulo é destacada a correlação entre a sensibilidade de isolados clínicos de *Leishmania (Leishmania) infantum* com os resultados laboratoriais dos pacientes e seus desfechos clínicos.

A pesquisa realizada é vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente - PPGSA da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e desenvolvida principalmente no Laboratório de Genética e Biologia Molecular – LabGeM, ligado ao Departamento de Biologia da UFMA. A área de concentração do estudo é “Saúde das Populações” e a linha da pesquisa “Biotecnologia Aplicada à Saúde”. O estudo contempla integralmente as propostas do PPGSA, considerando que a Leishmaniose é uma doença endêmica do Maranhão, afetando a saúde e o bem-estar da população maranhense, dessa maneira, investigações experimentais que utilizam a biotecnologia para realização de pesquisas que visam melhorar qualidade de vida da população, além de contribuir para diminuição dos números de casos graves e óbitos, são fundamentais para assegurar desenvolvimento humano no estado.

Em continuidade aos estudos anteriormente realizados pelo Grupo de Estudos em Biotecnologia e Genética – BioGen, propomos a realização dessa dissertação apresentada na forma de dois capítulos, sendo o primeiro submetido a revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz e o segundo será submetido a revista *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*. Esses dois capítulos são independentes, contudo, seus resultados se complementam e em conjunto reverberam respostas que têm o potencial de contribuir profundamente para o entendimento dos fenômenos estudados. Investigamos nesse estudo correlações não encontradas na literatura, com 13 isolados clínicos e as características clínicas dos 13 pacientes acometidos com a Leishmaniose Visceral, ressaltando mais uma vez a importância e o tamanho dos resultados obtidos, os quais foram ainda mais reforçados por uma revisão literária dos últimos 30 anos, sendo esses os principais objetivos.

JUSTIFICATIVA

O estado do Maranhão é uma região de alta endemia para Leishmaniose e assim como nos demais estados, é importante a investigação da prevalência de casos, fatores de agravamento, recidivas e resistência medicamentosa nesses pacientes. Nos últimos anos, as equipes multiprofissionais de saúde têm relatado número considerável de casos de Leishmaniose, refletindo também em agravamentos clínicos e sucessivos quadro de Falhas de Tratamento e Recidivas Clínicas, mesmo em uso dos fármacos preconizados pelo Ministério da Saúde do Brasil.

Diante desse cenário, nosso grupo de pesquisa, tem se dedicado a avaliar fatores moleculares do parasita que possam explicar os achados clínicos nos pacientes. A literatura já descreve que existem isolados clínicos de *Leishmania spp* com diferenças na tolerância aos fármacos. Assim, entender quais fatores estão correlacionados aos casos de Falhas de Tratamento e Recidivas clínicas na literatura mundial e estuda a sensibilidade fenotípica desses isolados clínicos é fundamental, uma vez que no aspecto da Saúde Pública pode indicar uma relação com as complicações clínicas nos pacientes. Esses dados, podem inclusive subsidiar a necessidade de novos tratamentos, considerando uma melhor compreensão da interação entre aspectos do parasita e fatores do hospedeiro.

Diante de tais questões crucias para uma compreensão holística de todos os fatores que envolvem o quadro clínico de Leishmaniose, quais fatores e mecanismos estão associados as ocorrências de Falhas de Tratamento e Recidivas Clínica? A sensibilidade do *Leishmania (Leishmania) infantum* pode influenciar/interferir nas principais variáveis clínicas e laboratoriais apresentadas pelos pacientes com Leishmaniose Visceral? As manifestações clínicas de maior gravidade estão correlacionadas com a presença de um isolado clínico mais tolerante (resistente) aos fármacos no paciente? Para tentar responder esses questionamentos, esta pesquisa foi realizada, sendo até onde temos informações encontradas na literatura, a primeira a utilizar isolados clínicos obtidos de pacientes de uma área de alta endemia e correlacionar os dados experimentais com os aspectos clínicos e laboratoriais de pacientes com Leishmaniose Visceral.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Relacionar os dados clínicos e laboratoriais de pacientes com LV com a sensibilidade *in vitro* dos isolados clínicos de *Leishmania (Leishmania) infantum*, bem como realizar uma Revisão de Literatura sobre os mecanismos de FT e RC na Leishmaniose.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma Revisão de Literatura sobre FT e RC em uma perspectiva multifatorial em LC e LV;
- Avaliar a tolerância *in vitro* da forma promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* frente ao Antimônio trivalente e a Anfotericina B;
- Determinar o perfil clínico-epidemiológico dos pacientes com LV do qual foram obtidos os isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum*.
- Aplicar correlação entre os dados clínicos dos pacientes com LV e os dados de sensibilidade *in vitro*.

CAPÍTULO I

Artigo de Revisão (Memórias do Instituto Oswaldo Cruz)

Qualis - Interdisciplinar: A2

Fator de Impacto: 2.55

Falha de Tratamento e Recidivas Clínicas nas Leishmanioses em uma perspectiva multifatorial: aspectos clínicos, fatores associados ao parasito e hospedeiro

Gustavo de Almeida Santos^{1,2} e Mayara Ingrid Sousa Lima*^{1,2,3}.

1 Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil.

2 Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil.

3 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil.

* Corresponding author: Mayara Ingrid Sousa Lima

Department of Biology, Federal University of Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, CEP 65080-805, Maranhão, Brazil. E-mail address: mayara.ingrid@ufma.br (M.I.S. Lima)

Resumo

As Leishmanioses são doenças causadas pelo protozoário do gênero *Leishmania* spp., cujo os fármacos utilizados para o tratamento das doenças são limitados, sendo recorrentes casos de Falha de Tratamento e Recidiva Clínica. Assim, nosso objetivo foi realizar uma Revisão Sistemática de Literatura acerca dos fenômenos envolvidos nas Falhas de Tratamento e Recidivas Clínicas nas ocorrências de Leishmanioses. Foram incluídos estudos publicados entre 1990 e 2021 em português, inglês e espanhol, sendo inseridas pesquisas populacionais com abordagem no hospedeiro humano, estudos experimentais com enfoque no parasito e relatos de caso. Foram incluídos 64 artigos divididos em três categorias: Relatos de Caso (26 artigos), apontam a Leishmaniose Cutânea relacionada a Falha de Tratamento e Recidiva Clínica (47,6%), acometendo o sexo masculino (74%) e crianças (67%). Já nos dados experimentais com foco no parasito (19 artigos), a *L. major* teve maior representatividade (25%), já sobre os mecanismos envolvidos na Falha de Tratamento e Recidiva Clínica, foi observado uma forte presença de alterações do DNA ou do nível de expressão (44,82%) no parasito. Os dados Populacionais com foco no Hospedeiro (19 artigos), quanto aos mecanismos e fatores associados a Falha de Tratamento e Recidiva Clínica, 36% dos autores correlacionaram os fenômenos a característica imunológicas do hospedeiro. Concluímos que a Falha de Tratamento e Recidiva Clínica nas Leishmanioses é multifatorial e apresenta peculiaridades intrínsecas a cada tipo de manifestação clínica, sendo o fator imunológico o mais associado pelos autores a esses fenômenos, além da adaptação do parasito aos fármacos utilizados no tratamento das doenças.

Palavras-chaves: Recaída. Falha Terapêutica. Resistência Medicamentosa

Introdução

As Leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas crônicas causadas por protozoários parasitos de mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*, as quais ocasionam

diferentes tipos de manifestações clínicas, reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como Leishmaniose Cutânea (CL), Leishmaniose Mucocutânea (MCL) e Leishmaniose Visceral (VL) (ALVES *et al.*, 2018; WHO, 2022).

A quimioterapia é a principal ferramenta para o controle do parasito no hospedeiro, contudo, o conjunto terapêutico disponível é bastante limitado, sendo atualmente restrito a duas linhas de fármacos: os antimoniais (Estibogluconato de Sódio- Pentostam® e o Antimoniato de Meglumina- Glucantime®) e os não-antimoniais (Pentamidina, Anfotericina B, Paromomicina e Miltefosine). No tratamento de CL e MCL, além destes podem ser utilizados derivados azólicos (Cetoconazol, Itraconazol e Fluconazol) (BANSAL *et al.*, 2019; FRÉZARD *et al.*, 2001; CHAKRAVARTY e SUNDAR, 2019). Tanto para forma clínica visceral quanto para as formas tegumentares, esses fármacos podem ser utilizados individualmente ou associados entre si em forma de terapia combinada, dependendo do quadro clínico da pessoa infectada e do julgamento da equipe médica de acompanhamento.

Os casos onde a terapia farmacológica não consegue reduzir o processo infeccioso e conseqüentemente não leva à cura da doença, caracterizando falhas de tratamento, não são incomuns, assim também como os casos de ressurgimento dos sinais e sintomas clínicos após o fim do tratamento denominadas recidivas clínicas (DAS *et al.*, 2005). A Organização Mundial da Saúde define dois diferentes conceitos principais para o insucesso na terapia contra leishmanioses: a recidiva clínica e falha de tratamento. O detalhamento desses termos será apresentado nos resultados do presente artigo, dado que existem adequações conceituais a cada região de ocorrência destas doenças no globo e variam para cada tipo de manifestação clínica.

Vale ainda ressaltar que apesar da Falha de Tratamento e a Resistência Medicamentosa serem frequentemente relatadas como sinônimos na literatura, trata-se de conceitos diferentes. A resistência de parasitos a fármacos, é apenas um dos fatores que podem levar à Falha de Tratamento (VANAERSCHOT, 2014).

Nesse contexto, o presente artigo tem por objetivo realizar uma revisão sistemática de literatura acerca dos mecanismos descritos nas Falhas de Tratamento e Recidivas Clínicas nas diferentes manifestações clínicas da Leishmaniose. Apresentaremos em uma perspectiva multifatorial das principais características clínicas e epidemiológicas dos pacientes descritos em relatos de casos com TF ou CR, bem como uma síntese dos principais achados na literatura com estudos experimentais que possibilitem explicar as contribuições do parasito e do hospedeiro nessas manifestações clínicas.

Metodologia

Protocolo de revisão de literatura

Este estudo trata-se de uma Revisão Sistemática de Literatura, cujo o protocolo foi submetido no Registro Internacional Prospectivo de Revisões Sistemáticas (PROSPERO) sob número: CRD42022320963 (acessar em: https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?ID=CRD42022320963). Como garantia do rigor científico, as diretrizes do Relatório Preferencial de Revisões Sistemáticas e Meta-Análises (PRISMA) foram seguidas para elaboração desta revisão.

Fontes de dados e estratégias de pesquisa

Esta revisão utilizou artigos publicados entre os anos de 1990 até o mês de outubro de 2021, que abordam as temáticas de recidivas clínicas e falha de tratamento nas leishmanioses. As buscas estruturadas foram realizadas nas bases de dados PubMed, Science Direct e Scielo utilizando como descritores previamente selecionados pelo site Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) (acessar em: <https://decs.bvsalud.org/>): recidiva, recaída, recorrência, recorrente, recrudescência, falha de tratamento e falha terapêutica e seus equivalentes em inglês e espanhol, utilizados individualmente ou combinados entre si através dos operadores booleanos OR e AND. Um resumo da seleção dos artigos pode ser visualizado na Figura 1.

Crítérios de inclusão e exclusão

Foram considerados elegíveis os estudos populacionais e experimentais com abordagem no hospedeiro humano, estudos experimentais com enfoque no parasito e relatos de caso que abordavam sobre recidivas clínicas e falhas de tratamento em pacientes humanos considerando todas as formas clínicas da doença. Os idiomas considerados foram: português, inglês e espanhol e o recorte temporal entre 1990 a 2021.

Estudos com informações incompletas, duplicados nas bases de dados, em idiomas não pré-estabelecidos, com abordagem em outros hospedeiros não humanos, bem como outras revisões foram excluídos dessa análise. Para os trabalhos de revisão na abordagem desse artigo, procedeu-se com a busca na lista de referências dos mesmos para inclusão de artigos adicionais que atendessem aos critérios pré-estabelecidos.

Processo de Seleção

Após a leitura dos títulos e seus respectivos resumos, a seleção foi feita por dois revisores de forma cega através do software Mendeley considerando os critérios de inclusão

deste trabalho. Os resumos que apresentassem informações completas foram selecionados para leitura na íntegra do artigo para avaliar sua adequação com os critérios de elegibilidade. De modo independente, dois revisores leram todos os trabalhos selecionados e caso houvesse discordância um terceiro revisor avaliou os estudos.

Extração dos dados

Os dados extraídos dos artigos foram organizados em tabelas do Microsoft Excel conforme a categoria de abordagem de cada estudo. As variáveis selecionadas dos estudos foram: ano de publicação, primeiro autor, origem do artigo, espécie de *Leishmania* identificada, forma(s) clínica(s) apresentada(s), sexo e idade de pacientes, quantidade de pacientes, fármaco(s) utilizado(s), esquemas terapêuticos empregados, desfechos clínicos, presença de imunossupressão nos pacientes, utilização de cepa de referência e/ou isolado clínico em experimentos, presença de promastigotas e/ou amastigotas e fatores associados a TF e CR.

Análises

Para interpretação e apresentação dos resultados, foi utilizado a metodologia de estatística descritiva para organizar, resumir e descrever os aspectos importantes das principais características analisadas. Em relação à comparação dos dados, foi descrito as principais tendências existentes entre os achados, como semelhanças, diferenças e particularidades consoante o enfoque utilizado em cada estudo.

Resultados e Discussão

Compreendendo as variações dos conceitos de Falha no Tratamento e Recidivas Clínicas em Leishmaniose

Com a finalidade de melhor abordar o conceito de Falha de Tratamento e Recidiva Clínica foram sumarizadas na Tabela 1 as descrições da Organização Mundial da Saúde (OMS) para cada região de ocorrência das Leishmanioses.

O conceito de Recidiva Clínica tem como base principal o reaparecimento dos sinais e sintomas em ambas as doenças (VL e CL), contudo, possuem diferenças de região para região quando abordam a respeito do período mínimo e máximo para se considerar um CR, além do acréscimo de outros parâmetros utilizados para confirmar o quadro clínico, como a necessidade de confirmação diagnóstica em exame parasitológico. Em todos os diferentes documentos da OMS avaliados havia descrição conceitual para recidiva clínica.

Entendemos as individualidades acerca de cada região que relata episódios de CL e VL em pacientes com Leishmaniose e como essas doenças impactam de maneira diferente suas populações, justificando, dessa forma, possíveis diferenças acerca da periodicidade de retorno de sintomas para a classificação da recidiva clínica. Contudo, ressaltamos que a ausência de uniformidade entre os conceitos de Falha Tratamento e Não-resposta pode ser um fator de confusão, por isso estão expressos na Tabela 1, onde são apresentadas as variações de acordo a localidade. Isto porque foi observado que o cerne da explicação destes conceitos foi muito semelhante entre diferentes documentos que não os apresentavam concomitantemente, evidenciando que estes podem ser confundidos como sinônimos entre diferentes países. Ao mesmo tempo, haviam documentos que traziam os dois conceitos, e englobavam a não resposta como um tipo de Falha de Tratamento. Observa-se, portanto, que não há consenso sobre o conceito de Falha de Tratamento e Não-resposta entre diferentes regiões do globo afetadas pela Leishmaniose, sendo em algumas regiões considerado termos sinônimos.

O documento destinado à região europeia, por exemplo, não apresenta o conceito de Falha de Tratamento, somente de não-resposta e recaída. Em contrapartida, para as Américas e Região do Mediterrâneo Oriental a terminologia “Falha de Tratamento” está presente, porém não há conceito sobre “não resposta”. Ao mesmo tempo, para os documentos da República do Sudão e para o Sudeste asiático três conceitos são apresentados, sendo a “Não-Resposta” classificada como um tipo de Falha de Tratamento. Apenas o conceito de Recaída clínica se manteve presente em todos os manuais. Observa-se, portanto, que não há consenso sobre o conceito de Falha de Tratamento e Não-resposta entre diferentes regiões do globo afetadas pela Leishmaniose, sendo em algumas regiões considerado termos sinônimos.

Dessa maneira, propomos a implementação da uniformização de maneira mundial dos conceitos de Recidiva Clínica e Falha de Tratamento nas formas visceral e cutânea, com base em todos os conceitos apresentados pela Organização Mundial de Saúde descritos na Tabela 1 e relatado pelos autores Rijal *et al.* (2013), Ostyn *et al.* (2014) e Ponte-Sucre *et al.* (2017). Entendemos que existem duas formas principais de Falha de Tratamento: a Não-Resposta e a Recidiva Clínica (e morte no caso da Leishmaniose Visceral), sendo esse um conceito mais amplo, que abrange todas as formas de insucesso terapêutico.

Na forma visceral, compreendemos a Recidiva Clínica seria qualquer reaparecimento de sinais e sintomas clínicos de Leishmaniose Visceral com confirmação parasitológica em um período de até 12 meses (para regiões endêmicas) ou a qualquer momento após cura clínica (para regiões não endêmicas). Na forma cutânea, entendemos a Recidiva Clínica seria a

reativação de nódulos, placas ou ulcerações a qualquer momento após a cura inicial, com confirmação parasitológica.

Propomos a Organização Mundial de Saúde e toda a comunidade científica a utilização e implementação desses conceitos conforme descrevemos, a fim de contribuir para uma caracterização uniforme dos desfechos clínicos nas Leishmanioses, corroborando dessa maneira, para um melhor controle da doença de modo epidemiológico, além de direcionar de forma mais efetiva a realização de estudos com base em um conceito consistente e integrativo das propostas anunciadas, permitindo ainda comparações, cruzamento de dados e correlações de estudos e pesquisas entre laboratórios, regiões, países e continentes.

Aspectos multifatoriais das Falhas de Tratamento e Recidiva Clínicas nas Leishmaniose

Os artigos incluídos em nosso estudo foram categorizados em três grandes áreas: relatos de caso, artigos experimentais com foco no parasito e estudos populacionais com foco no hospedeiro. O primeiro grupo apresenta resultados baseados na descrição dos aspectos clínicos e epidemiológicos de casos relatados em diferentes regiões do mundo classificados como recidivas clínicas ou falha terapêutica. Já os artigos com enfoque no parasito descrevem resultados baseados em testes de suscetibilidade de *Leishmania* às drogas *in vitro* e ou *in vivo*, bem como a utilização de abordagens moleculares, genômicas e pós-genômicas para identificação das espécies ou visando compreender os mecanismos relacionados a resistência a drogas. Finalmente, o terceiro grupo inclui pesquisas com resultados que realizaram investigações epidemiológicas a partir de prontuários de pacientes, com enfoque prospectivo e retrospectivo, bem como ensaios laboratoriais moleculares e imunológicos.

Essa pesquisa englobou os avanços tecnológicos e metodológicos dos últimos 30 anos a respeito das Falhas de Tratamento e Recidivas Clínicas na Leishmaniose, visando entender desde os trabalhos mais iniciais que utilizavam os métodos de pesquisa disponíveis na época até os mais recentes para compreender a ocorrência de TF e CR na Leishmaniose.

Relatos de caso

Após a aplicação dos critérios de exclusão previamente estabelecidos, foram selecionados 26 trabalhos categorizados como Relatos de caso, cujas informações podem ser visualizadas na Tabela S1. As informações foram sumarizadas por paciente (42 no total) e seus respectivos históricos clínicos e de tratamento. A América Latina liderou entre os locais relatados com o maior número de casos descritos (Figura 2a), sendo o Brasil, a Colômbia e a Guiana Francesa os países com maior quantidade de pacientes recidivantes (7 cada). No Brasil,

a região de maior ocorrência foi a Nordeste, e na Guiana e Colômbia, regiões compreendidas na área de floresta amazônica. De acordo com classificação da Organização Mundial da Saúde sobre o Status de endemicidade de CL e VL ao redor do mundo em 2020, todos os países presentes nos relatos descritos possuem algum grau de endemicidade ou tiveram casos previamente reportados de CL e LV em seus territórios (WHO, 2020a; WHO, 2020b).

A forma clínica com maior número de Falhas de Tratamento/Recidivas Clínicas relatadas foi a cutânea, com 47.6% dos pacientes acometidos (Figura 2c). Este dado é bastante coerente, pois, segundo a OMS, a CL é a apresentação mais comum da Leishmaniose (WHO, 2022). Contudo, a manifestação clínica visceral teve um total de 45.2% dos pacientes com Falhas de Tratamento/Recidivas Clínicas, não apresentando, portanto, grandes diferenças em termos quantitativos. As manifestações do tipo “Cutânea Difusa”, “mucocutânea” e manifestações múltiplas (mais de uma forma clínica presente) foram recorrentes em apenas 1 paciente cada. Em concordância com tais dados, as espécies identificadas no maior número de relatos foram *L. (V.) guyanensis* (18.9%), *L. (V.) panamensis* (13.5%) ambas causadoras de Leishmaniose Cutânea, e *L. (L.) infantum* (16.2%) responsável pela forma visceral da doença. Apesar desses dados, a maioria dos autores não chegou a fazer a identificação da espécie de *Leishmania* presente em seus pacientes (21.6%).

Acerca do sexo dos indivíduos afetados com recaídas, a população masculina demonstrou acometimento majoritário, com 74% dos pacientes sendo homens e apenas 26%, mulheres (Figura 2b). A prevalência de pacientes do sexo masculino também segue essa tendência a ocorrência de Leishmanioses ao nível global: conforme o relatório de Vigilância Global das Leishmanioses (2019 – 2020) da Organização Mundial da Saúde, a distribuição de casos de VL por gênero nos países de alta incidência apresentou, em 2020, 58% dos casos em pacientes do sexo masculino e 42% do sexo feminino. Já para CL, em 2018, 47% dos casos eram do sexo feminino e 52% masculino.

Um dado interessante explicitado no referido relatório, é que algumas regiões e países apresentam super-representação de pacientes do sexo masculino, como a região das Américas, que em 2018 teve apenas 30% de pacientes com CL do sexo feminino, e o país Brasil, que apresentou 89% dos pacientes de LV do sexo masculino em 2020 (RUIZ-POSTIGO *et al.*, 2021). Essas diferenças podem ser devido a fatores sociais e comportamentais (como a maior exposição masculina as áreas de risco de infecção e a menor busca por serviços de saúde) ou a fatores biológicos diretamente associados ao sexo (GUERRA-SILVEIRA & ABAD-FRANCH, 2013). Os autores Cloots *et al.* (2020) discutem que a prevalência de casos de LV na população masculina no subcontinente indiano não ocorre devido apenas a fatores socioculturais, também

é observada que diferenças biológicas entre os sexos desempenham papel na patogênese da doença.

A faixa etária com maior número de ocorrências de Falhas de Tratamento/Recidivas Clínicas relatadas foi a infantil (0 a 14 anos), sendo a forma visceral nesse grupo a mais comum, representando 67% dos casos (Figura 2c). A idade como fator de risco para ocorrência de recidivas já foi relatada por diversos autores, Campos *et al.* (2021) apontam a idade como um importante fator de risco para LV e correlaciona a infância com a possibilidade de 5 a 10 vezes maior de resposta insatisfatória a tratamentos em comparação com a idade adulta. Já Castro *et al.* (2016) em estudo com pacientes colombianos de CL, evidenciam, a baixa taxa de sucesso do tratamento com Antimoniato de Meglumina em pacientes com idade menor que 8 anos. Em estudo prospectivo em centros de saúde da Índia e do Nepal, Ostyn e colaboradores, em 2014 avaliaram o desfecho de clínico de 1.016 pacientes de LV tratados com miltefosina e a ocorrência de recaídas foi observada como 2 a 3 vezes mais frequente no grupo de 0 a 15 anos quando comparado aos grupos de pacientes adultos (OSTYN *et al.*, 2014). Esses resultados destacam a importância da realização de ensaios clínicos adequados para a faixa etária infantil, visto que é de conhecimento global que as crianças possuem sistemas imunológicos ainda imaturos sendo necessário determinar a segurança e eficácia na exposição a fármacos para esses pacientes.

A presença de estados de imunossupressão e comorbidades nos pacientes foi apontada em 28.6% dos indivíduos. Já cerca de 35.7% dos pacientes foram indicados pelos autores como imunocompetentes, e, um mesmo número de indivíduos não teve informações apresentadas acerca de seu estado imunológico. Este é um percentual elevado e um dado preocupante, considerando que em praticamente todos os relatos de pacientes imunossuprimidos os fatores imunológicos do hospedeiro foram apontados como responsáveis ou potencialmente relevantes na ocorrência da Falhas de Tratamento/Recidivas Clínicas. Porém, para outros 35% dos pacientes os autores não hipotetizaram ou sugeriram mecanismos e fatores que possam ter levado à não resposta de seus pacientes ao tratamento inicialmente administrado. Esse dado representa, até certo ponto, um resultado esperado, já que o formato de publicação “Relato de Caso” não exige a discussão de mecanismos envolvidos no fenômeno reportado e sim que aborde a casuística da recidiva.

O estado imunológico do paciente já foi apontado em outros estudos com este tipo de abordagem como grande determinante da ocorrência de recaídas no tratamento para VL. Em estudo recente, Franssen *et al.* (2021), demonstraram, em uma coorte com 98 pacientes com VL da Etiópia, que a recaída em pacientes com VL/HIV se deve à persistência de parasitos após

o tratamento clinicamente bem-sucedido que, na ausência de imunidade do hospedeiro totalmente funcional, são capazes de se restabelecer e ocasionar repetidas recaídas. A cura clínica em CL também foi previamente relatada na literatura como raramente associada à cura estéril, sendo a recaída diretamente ligada à persistência de parasitos nas cicatrizes (MENDONÇA *et al.*, 2004).

Além da ausência de cura estéril apontada por Mendonça *et al.* (2004), Castro *et al.* (2016) apontam diversas características clínicas e fatores relacionados à droga como determinantes da ocorrência de Falha de Tratamento. Em um trabalho de coorte conduzido com 230 pacientes colombianos com CL, a idade, a presença de linfadenopatias regionais, a duração da infecção e a baixa aderência ao tratamento foram altamente associados às falhas no tratamento (CASTRO *et al.*, 2016). Os autores Bamorovat *et al.* (2021), por sua vez, em estudo com 338 pacientes iranianos com CL, apontam correlação positiva entre a ocorrência de Falhas de Tratamento/Recidivas Clínicas com distintos determinantes de risco demográficos, clínicos e ambientais.

Fatores relacionados ao esquema terapêutico empregado foram destacados como relevantes em 26% dos casos (17% sobre a via de administração utilizada, 7% sobre tratamento inadequado e 2% sobre interrupção de tratamento) (Figura 2g). Não foi possível visualizar um padrão acerca dos tratamentos e possíveis relações entre fármacos e uma maior incidência de recidivas: 52% dos pacientes recidivaram após uso de um único fármaco e 48% recidivaram após o uso de dois ou mais esquemas sem sucesso. Os fármacos mais empregados ao nível mundial no tratamento das Leishmanioses (Glucantime[®]-Antimoniato de Meglumina e Anfotericina B) também foram os mais frequentemente administrados nos pacientes com recidivas. Os pacientes dos estudos avaliados no presente trabalho tratados com Glucantime[®] (sozinho ou em combinação) tiveram insucesso em 45% dos casos, enquanto os tratados com Anfotericina B (sozinha ou em combinação) representaram 43%. Essas porcentagens extremamente próximas evidenciam a baixa correlação entre a escolha de tratamentos e a chance de sucesso terapêutico inicial. Dessa forma, é possível perceber que as Leishmanioses contam com uma baixa gama terapêutica ao nível global e a combinação de terapias com fármacos pré-existent não garante sucesso.

Fatores intrínsecos do parasito (tais como a resistência de cepas, a presença do vírus LRV e a infecção por mais de uma cepa) foram associados a Falhas de Tratamento/Recidivas Clínicas por apenas 11% dos autores. É importante destacar mais uma vez, que o formato dos trabalhos analisados neste tópico foi “relato de caso” nos quais o foco de avaliação se encontra nos pacientes e não em seus agentes etiológicos. O tópico seguinte aborda com mais detalhes

artigos que produziram dados experimentais acerca dos parasitos do gênero *Leishmania* e suas possíveis relações com o insucesso de tratamentos com fármacos convencionais.

Dados experimentais com foco no parasito

Nessa categoria foram incluídos 19 artigos descritos na Tabela 2, os quais abordam diversos aspectos que buscam explicar a influência do parasito em episódios de TF/CR. Dos artigos incluídos nessa categoria, aproximadamente 72.7% realizaram pesquisas com espécies que causam a Leishmaniose Cutânea, dentre elas: *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. lainsoni*, *L. mexicana*, *L. killicki*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. tropica* e com maior destaque a *L. major* que correspondeu a 25% das espécies estudadas de TF/CR em CL. Já os estudos que utilizaram as espécies causadoras da Leishmaniose Visceral foram equivalentes a 27.2% e realizadas com às duas espécies relacionadas na literatura como responsáveis pela manifestação visceral da doença: *L. (L.) infantum* e a *L. (L.) donovani*, com maior prevalência da segunda espécie a qual correspondeu a 77.7% das pesquisas de TF/CR em VL. É importante considerar que os estudos com espécies que causam CL eram mais abrangentes, abordando mais de uma espécie em simultâneo (50.0% deles), entretanto, os estudos com VL abordavam somente uma das duas espécies. Ainda foi possível encontrar dois estudos que comparavam espécies de CL e VL ao mesmo tempo. Consoante a World Health Organization (2022), estima-se que ocorram anualmente em todo o mundo de 50.000 a 90.000 novos casos de VL, enquanto na CL essa estimativa é de 600.000 a 1 milhão de novos casos anualmente em todo o mundo. Nesse sentido, é possível entender porque existem mais casos relatados na literatura e estudos clínicos/laboratoriais com a CL, visto que existem mais de 20 espécies conhecidas como causadoras das Leishmanioses e somente duas dessas são apontadas cientificamente como responsáveis pela VL no mundo. As demais são classificadas como agentes etiológicos da CL e suas derivações, sendo encontradas diferenças significativas entre as espécies, como mostra o estudo dos autores Arevalo *et al.* (2007), os quais apontam diferença na sensibilidade de espécies de *Leishmania* ao tratamento com Sb^V em pacientes com CL, dessa maneira, mostrando que as espécies e a região geográfica onde houve a infecção podem afetar a eficácia dos tratamentos.

Dentre os fármacos utilizados, os Antimoniais foram predominantes, retratados por 52.6% dos estudos, em que 90% dos antimoniais foram usados na forma pentavalente do fármaco (Sb^V) e somente 10% na forma trivalente (Sb^{III}), sendo os antimoniais comerciais mais utilizados o Estibogluconato de Sódio (Pentostam®) e o Antimoniato de Meglumina (Glucantime®). Apontada como uma das alternativas no tratamento das Leishmanioses, a

Miltefosina foi o segundo fármaco mais utilizado nos estudos (26.3%) para avaliar os mecanismos do parasito frente à ação do fármaco. Também foram desenvolvidas pesquisas com fármacos não utilizados no tratamento das Leishmanioses, como a Glibenclamida destinada ao tratamento de diabetes *mellitus*, mas que pode apresentar um efeito Leishmanicida (15.8%). A Anfotericina B foi abordada por 5.2% dos estudos, sendo o fármaco menos utilizado nos estudos de TF/CR. É importante ressaltar que foram utilizados em nosso estudo somente, artigos que trabalharam com fármacos comerciais, não sendo incluídos fármacos/compostos em fase de validação laboratorial ou estudos com bioprospecção de novos produtos. A grande utilização dos Antimoniais nesses estudos se justifica, pois, esses fármacos foram recomendados por mais de sete décadas para o tratamento da VL alcançando uma taxa de cura > 90% ao nível global e na CL com uma variação entre 77– 90% de taxa de cura no mundo, sendo a primeira linha de tratamento na maioria dos países, mas apresentando problemas como a resistência em países como Índia e Nepal, conforme aponta a Organização Mundial de Saúde (2010).

A maioria (73.6%) dos estudos utilizou às duas formas de apresentação do *Leishmania* (promastigotas e amastigotas intracelulares) nas investigações realizadas. Estudos com as formas promastigotas foram utilizados nesse contexto para realização para indução de resistência *in vitro*, análise de sensibilidade do parasito aos fármacos e ensaios gênicos. Já com as formas amastigotas intracelulares é possível entender melhor sobre o comportamento do parasito em células de mamíferos através de testes de sensibilidade, avaliação de alterações na mediação de respostas imunológicas, alterações de vias bioquímicas, ensaios funcionais, entre outros como conduziram os autores como Purkait *et al.* (2012); Deep *et al.* (2017); Espada *et al.* (2021).

Os modelos experimentais empregados nos estudos foram classificados em 4 categorias: 1 - ensaios de sensibilidade *in vitro/in vivo* que correspondem a 27.9% das metodologias e englobam experimentos que objetivam avaliar fenótipos de sensibilidade e resistência a fármacos nos parasitos; 2 - ensaios funcionais foram realizados por 11.62% das pesquisas e engloba métodos relacionados ao entendimento de vias bioquímicas e metabólicas, bem como de interações proteicas no ambiente intracelular. Já em 3 - ensaios gênicos representam 30.23% dos métodos e inclui técnicas utilizados para avaliar mutações, alterações de números de cópias cromossômicas, superexpressão de genes, presença de SNPs e outras alterações ao nível genômico. A última categoria é a 4 - identificação/caracterização molecular do parasito obtiveram a porcentagem de 30.23%, utilizando principalmente PCR-RFLP ou sequenciamento para identificação da espécie dos parasitos.

Sobre os possíveis mecanismos para alteração de sensibilidade no parasito, que visam tentar explicar quais meios e fatores no parasito estão relacionados a TF/CR, foi realizada a categorização em: fatores associados a alterações do DNA ou nível de expressão gênica (44.8%), alterações de vias bioquímicas (20.6%), fatores associados à virulência e alterações na taxa de metaciclologênese (10.3%). Variação interespecífica natural, alteração da mediação da resposta imune, presença de infecção por vírus LRV e variação da resposta estágio-específicas foram equivalentes a 3.44% em cada um dos grupos.

As primeiras descrições sobre os possíveis mecanismos de ação de alguns dos fármacos estão classicamente abordados na literatura e consolidadas há alguns anos, os autores Lira *et al.* (1999) já apontavam que o Antimônio age sobre vias diferentes que afetam o parasito apresentando uma variação na resposta estágio-específica, na qual a resistência ao Estibogluconato de Sódio foi observada na forma promastigota de *L. donovani*, enquanto as formas amastigotas do parasito foram mais sensíveis à ação do fármaco. Assim como também a apresentação na variação interespecífica natural, analisada pelos autores Arevalo *et al.* (2007) em que é possível observar que diferentes espécies de *Leishmania* spp. possuem distintas respostas a terapia farmacológica, podendo o tipo de espécie influenciar no resultado do tratamento, a exemplo, as chances de ocorrências de TF, demonstradas pelos autores, quando destacam que a TF foi 3,5 vezes mais frequente em pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* em comparação aqueles infectados com *L. (V.) guyanensis*.

Sobre os fatores associados a alterações do DNA ou nível de expressão gênica, em uma ordem cronológica dos achados, foi possível observar: os primeiros resultados já destacavam ser possível identificar que as cepas de *L. mexicana* resistentes exibiam um aumento da expressão de P-glicoproteína (GARCÍA *et al.*, 2000) e um gene com *locus* no cromossomo 9 nos isolados de *L. major* conferia resistência ao Antimônio (SINGH, SINGH & SUNDAR, 2003). A expressão de transportadores ABC de ânions orgânicos por *Leishmania (L.) amazonensis* estão associados à resistência a Glibenclamida (MACHUCA *et al.*, 2006), o que também foi encontrado em *L. amazonensis* resistente ao Antimônio com expressão aumentada do ABC MRPA e elevados níveis de tiol (MONTE-NETO *et al.*, 2011). Já os autores Purkait *et al.*, (2012) relataram em estudo com Anfotericina B diferenças nos padrões de expressão dos transcritos de S-adenosil-1 metionina:C-24- Δ -sterol metiltransferase e a ausência de ergosterol, substituído por colest-5,7,24-trien-3 β -ol, além disso, alterações no nível de expressão do MDR1 indicam uma diminuição da afinidade da *L. donovani* com a droga. Segundo Jeddi *et al.*, (2014) foi possível observar a superexpressão dos genes de resistência em cepas de *L. (L.) infantum*: 14-3-3, P299, MRPA, GSH1, TRPER, AQP1 e H4, bem como foi encontrado a

superexpressão dos genes semelhantes (14-3-3, P299, AQP1 e H4) em isolados de *L. major*. Também foi identificada a relação entre deleções no *locus* MSL (Miltefosine Sensitivity *Locus*) e a sensibilidade da *L. (L.) infantum* ao tratamento com Miltefosina, correlacionando com casos clínicos que apresentaram Recidivas Clínicas (CARNIELLI *et al.*, 2018). Mais recentemente, foi observado em *L. major*, que a deleção parcial ou total do gene Ros3 pode estar envolvido na resistência do parasito a Miltefosina (ESPADA *et al.*, 2021). Dessa maneira, os dados demonstram que os fatores moleculares possivelmente associados à alteração na sensibilidade dos parasitos são multigênicos e com múltiplas vias de respostas envolvidas, além de variar entre as espécies, uma vez que um mesmo fármaco pode estar relacionado a diferentes vias de manifestação de fenótipo de resistência em diferentes espécies. Ou seja, não é possível na perspectiva gênica realizar uma abordagem individualizada para entender o fenômeno de resistência e correlacionar com CR/TF, considerando a expressão de múltiplos genes envolvidos com distintas vias de respostas para diferentes fármacos.

Para as alterações de vias bioquímicas, foi inicialmente observado em *L. mexicana*, que as cepas resistentes demonstraram uma diminuição da atividade de enzimas-chave funcionais, como a fosfatase ácida e a piruvato quinase (GARCÍA *et al.*, 2000); também foi ressaltado que a fosforilação de proteínas poderia desempenhar um papel na via de transdução de sinal no parasito após exposição a fármacos (SINGH, SINGH & SUNDAR, 2003); a ação da butionina sulfoximina no processo de sensibilização do parasito também foi demonstrada, visto que esse é um inibidor de γ -glutamilcisteína sintetase, estando relacionado com a resistência ao Glucantime® (HADIGHI *et al.*, 2006). Já os parasitos de *L. donovani* resistentes apresentam uma membrana celular mais fluida, viabilizada pela cascata de triparedoxina regulada positivamente e um nível de tiol intracelular mais reduzido (PURKAIT *et al.*, 2012). Os autores Deep *et al.*, (2017), relataram que em cepas resistentes de *L. donovani* houve uma redução da captação de Miltefosina, a diminuição do acúmulo de ROS e o aumento do conteúdo de tiol intracelular. Com isso, é possível entender algumas das alterações que merecem mais estudos, pois podem ser caracterizadas como preditivas de respostas adaptativas de cada espécie em relação a determinados fármacos.

Em relação aos fatores associados à virulência e à metaciclologênese aumentada do *Leishmania* spp. os autores Vanaerschot *et al.* (2011) relatam sobre a alta capacidade das cepas resistentes de *L. donovani* de causar infecção *in vivo*, com um perfil heterogêneo de infecção e uma carga parasitária várias vezes maior em relação a cepas sensíveis, o que também foi verificado por Ouakad *et al.* (2011) que relataram as características de maior aptidão encontradas em linhagens de *L. donovani* resistentes ao Antimônio Pentavalente, que possuem

maior capacidade de metaciclologênese. Os autores Deep *et al.* (2017) encontraram com essa mesma espécie um aumento da capacidade de infectividade e de metaciclologênese, o que também foi destacado por Turner *et al.* (2015), que afirmam que promastigotas de *L. major* resistentes à Miltefosina exibem metaciclologênese aumentada. Com isso, é possível entender o processo de adaptação das espécies de *Leishmania* causadoras de VL e CL, com apresentações de parasitos mais aptos, resistentes aos fármacos, mais virulentos e com maior capacidade de infectividade, o que pode ser um problema ainda maior no futuro, considerando o restrito espectro de fármacos comprovadamente eficazes no tratamento das doenças e que podem ser utilizados em humanos sem complicações por efeitos colaterais.

Ademais, a descoberta da presença de vírus LRV em *Leishmania* trouxe o questionamento se esse poderia influenciar na sensibilidade do parasito aos fármacos, entretanto, o estudo aqui encontrado dos autores Abtahi *et al.* (2020) revelou que não houve associação direta entre a presença do vírus LRV2 e a resposta ao Glucantime[®]. Entretanto, ainda estão sendo realizados estudos para melhor entender o impacto da presença desse vírus no desenvolvimento e tratamento da doença.

Além dos aspectos do parasito, também é importante considerar os fatores associados ao hospedeiro, haja vista que o sistema imunológico do hospedeiro tem relação comprovadamente estabelecida no acometimento e tratamento da doença, como destacam os autores Abadías-Granado *et al.* (2021).

Dados populacionais com foco no hospedeiro

Os artigos com foco no hospedeiro foram distribuídos entre estudos observacionais descritivos e analíticos e um trabalho experimental do tipo ensaio clínico. No total foram selecionados 19 artigos, dos quais 33% fizeram investigações imunológicas nos hospedeiros (contagem de células imunes e/ou dosagem de citocinas), 26% desenvolveram estudos de coorte retrospectivos e 19% estudos de coorte prospectivos. Ainda foram analisados, dois estudos do tipo série de casos, um estudo de caso-controle, um de corte transversal e um epidemiológico ecológico. A quantidade média de pacientes nos estudos foi de aproximadamente 237 indivíduos, variando de 4 a 1.761 pacientes. Todos os dados estão disponíveis e podem ser visualizados na Tabela 3.

O percentual de artigos que apontou pacientes classificados recidivantes foi de 57%, enquanto para Falha de Tratamento foi de 37%. Apenas dois estudos (11%) identificaram, entre as populações investigadas, tanto indivíduos recidivantes quanto com Falha de Tratamento, sendo que estes conceitos foram tratados como diferentes sem que um abrangesse o outro. Em

contrapartida, dentre os 19 estudos, três consideraram abertamente a recaída clínica como um tipo de Falha de Tratamento. Somente Gitari *et al.* (2018) utilizaram o termo “não responsivo” explicitamente como um tipo de Falha de Tratamento. Ressaltamos aqui que estes dados foram quantificados estritamente com base no que os próprios autores de cada artigo declararam como falha de tratamento, não resposta e/ou recaída clínica. Os conceitos foram divergentes entre os artigos, sendo observadas adaptações sobre a terminologia definida pela OMS, em especial acerca da periodicidade de reaparecimento dos sintomas.

Os autores Ostyn *et al.* (2014) e Rijal *et al.* (2013) seguem o conceito definido pela OMS, contudo ambos adaptam o tempo de reaparecimento dos sintomas para 6 a 12 meses ou simplesmente 12 meses após o término do tratamento, respectivamente. Já Simão, Vitória & Fortaleza (2020) ampliaram o período para 1 a 24 meses após completar a terapia inicial. Além da diversidade de períodos adotados, alguns autores consideraram outros critérios para confirmação do episódio de recaída. Já Goyal *et al.* (2020) não estabeleceram um intervalo de tempo para a recrudescência, porém determinaram a visualização de parasitos em aspirados do baço ou de medula óssea como necessária para classificação de recidiva com o reaparecimento de sintomas. Enquanto isso, Cipriano *et al.* (2017) atrelaram o diagnóstico da recaída clínica à necessidade de confirmação biológica da existência de parasitos em esfregaço ou exame cultural de sangue medular ou periférico, com pelo menos três critérios clínicos entre: febre intermitente, astenia, perda ponderal, sudorese, hepatomegalia, esplenomegalia, sintomas respiratórios e gastrointestinais; além disso, distinguiram o conceito de recaída biológica que corresponde à recirculação transitória de parasitos detectados por técnica de PCR e determinou um limiar de parasitemia de 10 parasitos/mL para ocorrência da CR.

A respeito dos trabalhos envolvendo pacientes com manifestações tegumentares, as definições para a TF e CR foram ainda mais diversas. Os autores León *et al.* (2013) e Chalco-Aguate *et al.* (2014) classificaram TF no primeiro mês após a última dose da droga empregada, enquanto Christen *et al.* (2018) adotaram o critério de persistência de lesões no período de 6 semanas após o tratamento. Já Castro *et al.* (2017) consideraram a TF como reepitelização incompleta e/ou presença de induração, bordas elevadas ou vermelhidão em qualquer lesão após o dia 90 e enquadraram o surgimento de novas lesões e a recaída como um tipo de TF. Contudo, Bourreau *et al.* (2015), por sua vez, consideraram a relapse baseada no retorno de pacientes ao consultório médico em até 1 ano após a realização do diagnóstico inicial. Os autores Gitari *et al.* (2018) não determinam um período para enquadramento de CR, porém estabelecem que pacientes que apresentaram ressurgimento de lesões inicialmente cicatrizadas após o término do tratamento ou tiveram placas com pápulas satélites foram classificados como recidivantes.

Dos 19 artigos, 10 avaliaram pacientes com VL (e destes, 6 com pacientes coinfectados), 8 com CL e 1 com MCL. Apenas 1 dos artigos que envolviam pacientes de VL investigou a ocorrência de PKDL. Um dado interessante é que a grande maioria das investigações com indivíduos de manifestações clínicas tegumentares foi em países da América Latina, tais como Brasil, Guiana Francesa, Colômbia, Peru e Bolívia; enquanto isso, as populações de indivíduos com VL foram estudadas, em sua maioria, em países do sudeste asiático e da África, como Índia, Nepal, Sudão e Etiópia. Segundo a WHO (2022), a múltipla circulação de espécies diferentes de *Leishmania*, as variações nos ciclos de transmissão, as manifestações clínicas e a resposta à terapia tornam a epidemiologia da CL nas Américas um fenômeno muito complexo, enquanto no sudoeste asiático a VL é a principal forma de manifestação da doença na região e surtos de VL são comuns na África Oriental.

Acerca da predominância de sexos nas populações estudadas, o acometimento majoritário de indivíduos do sexo masculino foi observado em 84% dos estudos. Como discutido anteriormente no tópico de “Relatos de Casos”, a prevalência de pacientes do sexo masculino ocorre tanto para VL quanto para CL ao nível global e este resultado foi concordante com o observado na Figura 2b acerca dos relatos de caso. Apenas 1 artigo envolveu mais pacientes femininas que masculinos em sua investigação (GITARI *et al.*, 2018). Três trabalhos não especificaram a quantidade de homens e mulheres na amostra. O percentual total de homens e mulheres em todas as populações com discriminação de sexos descrita foi de 65% e 35% respectivamente. Os autores Lockard, Wilson & Rodríguez (2019) argumentam que, além de fatores sociais e epidemiológicos, evidências experimentais e em infecções humanas sugerem a existência de predisposições biológicas que justificam a existência de diferenças relacionadas ao sexo dos indivíduos e suas respectivas respostas imune e manifestações sintomáticas em infecções por *Leishmania* spp. Entretanto, o fato de mais pessoas do sexo masculino desenvolverem as manifestações clínicas das Leishmanioses precisa ser melhor avaliado e investigado, considerando fatores que podem ou não ter relação com esse fenômeno como diferença no metabolismo e/ou hormônios liberados entre hospedeiros de sexos diferentes, possíveis diferenças de preferência alimentar do vetor hematófago, entre outros.

A coinfeção com vírus HIV foi uma variável presente em 32% dos trabalhos, todos eles com pacientes apresentando manifestação clínica visceral. Este era um dado esperado, visto que é extensamente relatado na literatura que a infecção por HIV aumenta o risco de desenvolvimento de VL e esta, por sua vez, promove o desenvolvimento de condições definidoras de AIDS (RUIZ-POSTIGO *et al.*, 2021). Em trabalhos com pacientes de CL e MCL, a variável da coinfeção não esteve presente. Em 37% dos trabalhos não foi informado se havia

coinfecção LV/HIV entre os indivíduos do estudo. Segundo a Organização Mundial da Saúde, pacientes coinfectados LV/HIV com contagem de CD4+ < 200 células/ μ L normalmente sofrem com recaídas clínicas progressivamente mais frequentes, até se tornarem irresponsivos a todos os fármacos usados (WHO, 2010a).

Seis tipos de fatores de risco para TF/CR foram identificados pelos autores. As características imunológicas do hospedeiro foram destacadas entre 36% dos fatores, sendo a associação feita com mais frequência como fator de risco entre os estudos analisados. Esse dado foi coerente com o encontrado anteriormente no tópico “Relato de Casos”, em que 25% dos relatos de caso tiveram a TF/CR associada à imunologia dos pacientes (Figura 2g). Um dado que deve ser ressaltado é que a média de idade das populações estudadas foi majoritariamente adulta, havendo apenas 1 trabalho com expressiva presença de pacientes da faixa etária infantil (CASTRO *et al.*, 2017). Entende-se que em termos numéricos, a população adulta tenha maior representatividade nos casos gerais de Leishmanioses: em 2020, 58% da população afetada por VL em 10 dos 14 high-burden countries tinha idade maior ou igual a 15 anos, enquanto em 2018, 55% da população afetada por CL se enquadrou nesta mesma faixa etária (RUIZ-POSTIGO *et al.*, 2021). No entanto, ressaltamos aqui a necessidade de realização de mais estudos voltados especificamente para a faixa etária infantil, dado que as crianças possuem sistemas imunológicos ainda imaturos, o que pode estar associado a desfechos clínicos caracterizados pela Falha de Tratamento.

Variáveis clínicas dos hospedeiros estavam associadas a TF/CR por 29% dos autores. O esquema terapêutico foi apontado por 21% dos autores como fator de risco, enquanto a via de administração dos fármacos por 7%. Apenas 1 trabalho (4%) destacou a importância do vírus LRV1 e 1 trabalho evidenciou fatores epidemiológicos ecológicos como determinantes.

A World Health Organization (2010a) aponta que os fatores de risco para a CR são: a não realização do tratamento antirretroviral, a baixa contagem de células CD4+, episódios prévios de Leishmaniose Visceral e a falha na obtenção de cura clínica ou parasitológica durante o primeiro episódio e sem profilaxia secundária. Como a WHO define que a CR é uma forma de TF, entende-se que esses fatores de risco também são para FT. Os dois primeiros fatores de risco destacados pela WHO estão diretamente relacionados aos achados nessa pesquisa onde a maioria (36%) dos autores apontaram características imunológicas do hospedeiro como fatores associados ao desenvolvimento de TF/RC, como: menores aumentos na contagem de células CD4+, aumentando as chances de CR e em alguns casos a terapia antirretroviral bem-sucedida em pacientes coinfectados com VL/HIV pode não ser suficiente para controlar a doença (CASADO *et al.*, 2001); segundo os autores Pasquau *et al.* (2005), o gênero feminino foi

considerado um fator de risco para o desenvolvimento de CR em pacientes acometidos com VL; Já para Tuon *et al.* (2008), uma apresentação de níveis teciduais elevados de células TCD8+ e NK, um baixo número de macrófagos e alta proporção de células produtoras de IFN- γ /IL-10 em paciente afligidos pela Leishmaniose Mucosa é destacada como importante para FT/CR; Contudo, Leon *et al.* (2013) consideram que o nível de ativação da resposta Th1 maior em pacientes de CL que tiveram fracasso terapêutico ao antimonial que em pacientes que responderam exitosamente ao tratamento; Os resultados de Ostyn *et al.* (2014) e Goyal *et al.* (2020), concluem que a idade jovem, dada a imaturidade do sistema imunológico, pode comprometer o desfecho final após o tratamento; além disso, o sexo masculino foi associado ao aumento do risco de recidiva da LV após tratamento com a Miltefosina, assim como acreditam que uma falha na manutenção da resposta imune dependente de células T estejam envolvidas nesse processo; Segundo Elmekki *et al.* (2016), o aumento significativo de TGF β está associado a TF em pacientes com VL tratados com Estibogluconato de Sódio; Cipriano *et al.* (2017) apresentam resultados que confirmam o descrito por Casado *et al.* (2001), destacando que a ausência de tratamento antirretroviral e a contagem de células TCD4+ inferior a 100 células à data da primeira infecção, bem como a manutenção de valores de células TCD4+ inferiores a 100 em pessoas acometidas com VL descritas pelos autores como fatores de risco para recidivas e falhas; Já os autores Simão, Vitória & Fortaleza (2020) associam a CR a coinfeção por HIV, a presença de edema de membros inferiores, a baixa contagem de plaquetas na admissão e pneumonia secundária em pessoas com a manifestação visceral da doença.

Entre os fatores clínicos associados a TF/CR descritos pelos autores (29%), tratamento prévio para leishmaniose, três ou mais lesões, tratamento irregular e peso maior que 68kg foram associados a TF em pacientes com CL tratados com Antimoniato de Meglumina foram relatados por Rodrigues *et al.* (2006); Para Llanos-Cuentas *et al.* (2008), os fatores de risco para TF são, duração da doença <5 semanas, lesão adicional, infecção por *L. (V.) peruviana* e por *L. (V.) braziliensis* em pacientes com CL tratados com Estibogluconato de Sódio; Para Castro *et al.* (2017), a presença de linfadenopatia regional, duração da doença ≤ 1 mês, baixa adesão ao tratamento (<90%) foram associados a TF; Os autores Simão, Vitória & Fortaleza (2020), observaram em seu estudo que a CR foi associada a coinfeção por HIV, a presença de edema de membros inferiores, a baixa contagem de plaquetas na admissão e pneumonia secundária; Os autores Llanos-Cuentas *et al.* (2008), ainda associam fatores de risco epidemiológicos para TF como a permanência <72 meses na área de aquisição da doença.

Sobre os fatores de esquema terapêutico (21%) e via de administração dos fármacos (7%) associados a TF/CR, os autores Troya *et al.* (2008), concluem que o uso de Miltefosina

como monoterapia não é suficiente para curar a VL recidivante em pacientes infectados controlados pelo HIV-1. Para Castro *et al.* (2017), o tratamento com Antimônio Pentavalente foi associado a TF. Os autores, Cipriano *et al.* (2017), mostram casos de pacientes com VL tratados com Anfotericina B Lipossomal e Miltefosina em cursos de monoterapia que tiveram vários episódios de TF/CR. Esses dados estão em concordância com os autores Goyal *et al.* (2020), onde a densidade de incidência de recaída foi maior em pacientes com VL tratados com Anfotericina B e Miltefosina; Já para Gitari *et al.* (2018), o tratamento irregular e/ou não contínuo como preconizado estão relacionados com o desenvolvimento de TF/CR. Assim como o tratamento com AmBisome também foi associado a um maior risco de desenvolvimento de CR pelos autores Goyal *et al.* (2020).

Quando abordados sobre a relação entre a via de administração de fármacos e o surgimento de TF/CR, Chalco-Aguate *et al.* (2014) afirmam que a administração de um esquema endovenoso de Estibogluconato de Sódio para pacientes com CL por *L. braziliensis* e *L. guyanensis* pode estar correlacionado a TF, sendo o esquema por via intramuscular apresenta maior eficácia e diminuição de hepatotoxicidade, entretanto, Christen *et al.* (2018) descrevem que o uso de pentamidina intramuscular no tratamento da CL por *Leishmania guyanensis* está associado a mais falhas no tratamento do que o Isotionato de Pentamidina intravenoso. Dessa maneira, cogita-se que o uso da monoterapia nos casos de Leishmanioses poderá entrar em um longo processo de substituição, dado ao fato da maior frequência de TF/CR nesse método e a possibilidade de utilização de fármacos em concomitância, entretanto, esquemas com a utilização de mais de um fármaco precisam ser bem avaliados, considerando os efeitos tóxicos que esses fármacos podem ter sobre o corpo. Assim, ainda não está claro o real impacto que a via de administração do fármaco teve no desfecho final do quadro clínico de Leishmaniose.

Curiosamente, encontramos dois trabalhos que apontam que pacientes infectados com a *L. (V.) guyanensis* possuem uma menor associação a TF com Antimoniais Pentavalentes que pacientes infectados com outras espécies como *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) braziliensis* (AREVALO *et al.*, 2007; LLANOS-CUENTAS *et al.*, 2008). Entretanto, os autores Romero *et al.* (2001) também estudaram pacientes infectados com essas espécies e os resultados foram completamente diferentes, mostrando uma alta taxa de TF em pacientes infectados com *L. (V.) guyanensis* e tratados com Antimoniato de Meglumina, reforçando o argumento da diferença na resposta entre espécies a um mesmo fármaco, além das diferenças na resposta de uma mesma espécie em distintas regiões.

A espécie *L. (V.) guyanensis* também teve destaque em trabalhos que avaliaram a presença e a influência do LRV no desfecho clínico de pacientes, sendo aqui correlacionados

todos os trabalhos encontrados nos tópicos “Relatos de Caso, “Dados experimentais com foco no parasito” e “Dados populacionais com foco no hospedeiro” sobre LRV. Onde os resultados foram conflitantes, mostrando uma relação dessa espécie com a TF e CR em pacientes imunocompetentes e tratados com Pentamidina e Glucantime® na França pelos autores Bourreau *et al.* (2015), enquanto na Guiana Francesa e França continental os autores Christen *et al.* (2018) encontraram resultados opostos em pacientes sem HIV e tratados com Pentamidina. Já no Brasil, os autores Vieira-Gonçalves *et al.* (2019) hipotetizam que a presença do LRV1 contribuiu para o aumento da virulência do parasito em pacientes imunocompetentes, infectados com a *L. (V.) naiffi* e tratados com Pentamidina, contudo, no Irã, Abtahi *et al.* (2020) relata que a presença do LRV2 na *L. major* não apresentou diferenças significativas na resposta ao Glucantime®.

Muitos estudos presentes na literatura já constataram anteriormente a influência da infecção por LRV na virulência de parasitos e o risco de desenvolvimento e agravamento de lesões mucosas em pacientes com Leishmaniose Tegumentar, tais como os trabalhos conduzidos por Ives *et al.* (2011) e Cantanhêde *et al.* (2015). No entanto, entende-se que a influência do Leishmania RNA Vírus no desfecho clínico de pacientes ainda não está elucidada e não há consenso sobre seu impacto na ocorrência de TF e CR. Não foram encontrados trabalhos que abordassem a presença do LRV na LV, o que era um resultado esperado, visto que a presença do vírus LRV1 é relatada apenas em parasitos sul-americanos, que causam manifestações tegumentares, do subgênero *L. (Viannia)* (HARTLEY *et al.*, 2012). Contudo, Scheffter *et al.* (1995) descreveu a única ocorrência de LRV vírus fora do subgênero *Viannia*, que ocorreu na cepa *L. (Leishmania) major* (MHOM/SU/73/5-ASKH), classificada como LRV2.

Considerações Finais

Como muitas das doenças negligenciadas, a maioria dos processos que envolvem a Leishmaniose ainda não são os melhores possíveis, como no diagnóstico que usa métodos parasitológicos com determinada sensibilidade e a coleta da medula óssea que é extremamente invasiva, desconfortável e dolorido para o paciente. Assim com os efeitos colaterais causados pelos medicamentos, uma possível falta de protocolo geral para os todos os desfechos clínicos encontrados na doença (NR, RC, FT, óbito e cura), a diminuição na eficácia dos medicamentos e o limitado espectro de fármacos disponíveis no mercado. Sem considerar a falta métodos mais efetivos de prevenção e promoção de saúde contra a Leishmaniose, o que dificulta ainda mais o controle da doença.

As Leishmanioses continuam a ser um problema de saúde pública em muitos países, existindo atualmente mais de 1 bilhão de pessoas que vivem em áreas endêmicas para estas doenças. A notificação de casos de TF em pacientes com as mais diversas manifestações clínicas configura um fenômeno que se mostra multifatorial, podendo ser atrelado a condições específicas dos hospedeiros e dos agentes etiológicos. No presente artigo foram investigados fatores apontados como envolvidos na ocorrência de Falha de Tratamento e Recidiva Clínica nos casos de Leishmanioses.

A VL e a CL apresentaram diferenças expressivas em todas as análises estudadas. A América Latina liderou o percentual de relatos de casos e também foi destacada como principal fonte de estudos populacionais focados no hospedeiro quando consideramos a CL. Enquanto isso, países do leste do Mediterrâneo e Sudeste Asiático lideraram estudos com VL. Além da distribuição geográfica, o conceito de TF e CR, assim como os resultados encontrados em todas as pesquisas foram bastante distintos para essas duas apresentações da doença, evidenciando a necessidade de realização de diferentes abordagens para ambas. Dessa maneira, os aspectos de entendimento de TF e CR devem ser considerados de maneiras diferentes para essas duas principais formas clínicas da doença, destacando todos fatores envolvidos nesses dois casos.

A variável da coinfeção com vírus HIV não foi expressiva em estudos envolvendo pacientes com CL. Os fatores de risco associados a TF/CR, por sua vez, foram mais diversificados para esta manifestação clínica, tais como a via de administração dos fármacos, a presença de vírus LRV, a imunologia dos hospedeiros, a resistência de parasitos, a presença de certos quadros clínicos e epidemiológicos e mesmo o emprego de diferentes esquemas terapêuticos. A TF na VL, por outro lado, foi mais abundantemente relacionada a fatores clínicos e imunológicos do hospedeiro, com grande enfoque para a coinfeção VL/HIV e alguns estudos abordando esquemas terapêuticos como mais ou menos associados a falhas. Essas observações evidenciam a complexidade presente na diversidade de espécies causadoras das Leishmanioses e seus respectivos vetores em diferentes áreas geográficas, ressaltando a necessidade de observar aspectos específicos para cada uma dessas manifestações clínicas em qualquer investigação feita.

A CL também teve destaque nos estudos com foco no parasito, dado que a maioria das pesquisas realizadas foi com espécies causadoras dessa forma da doença. Os trabalhos envolvendo pesquisas experimentais com parasitos tiveram grande foco na alteração de sensibilidade dos mesmos diante de fármacos e nos ensaios gênicos. Diversos genes foram observados como associados à resistência a diferentes fármacos, sendo que os antimoniais estavam presentes na maioria das investigações. Alguns trabalhos apontam para a possível

adaptação de parasitos mais virulentos e infectivos com metaciclogênese aumentada como um problema para o futuro.

A influência do vírus LRV na TF/CR foi investigada nas três abordagens (relatos de caso, experimentos com parasitas e estudos populacionais). Não foi notada a presença de consenso entre os resultados obtidos, ressaltando a necessidade de mais estudos sobre esse vírus e como este pode interferir no processo de infecção do *Leishmania* e desfecho clínico dos pacientes.

Entre as espécies de *Leishmania* spp. estudadas, a *L. guyanensis* esteve presente na maioria dos trabalhos dentre todas as categorias. A variação espécie-específica foi ressaltada novamente entre todas as categorias em estudos que avaliaram mais de uma espécie concomitantemente, demonstrando a concordância deste resultado mesmo com abordagens tão diferentes empregadas. Os fármacos mais investigados foram os antimoniais, e também foram observados estudos que identificaram TF mesmo em pacientes que recorreram à terapia combinada, apesar de este fenômeno ocorrer mais frequentemente na monoterapia. Ressaltamos aqui a grande associação observada entre a TF e o uso de fármacos exaustivamente empregados há anos nas diversas regiões endêmicas do mundo. A documentação de casos de cepas resistentes aos antimoniais especialmente no sudeste asiático ressalta a importância da pesquisa por novos fármacos que possam ter ação efetiva contra os parasitos do gênero *Leishmania*.

A população de sexo masculino foi a mais frequente tanto nos estudos de relatos de caso quanto nos estudos populacionais com foco no hospedeiro. Diante da grande disparidade numérica de pacientes homens em relação a mulheres e considerando estudos apresentados na discussão do presente artigo, os quais traziam evidências sobre possíveis diferenças biológicas entre sexos capazes de influenciar o curso da infecção, acreditamos que a prevalência no acometimento de indivíduos masculinos com as Leishmanioses não são devidas somente a fatores comportamentais e sociais, mas que pode ter influência de hormônios sexuais e diferenças metabólicas entre os sexos. Ressaltamos que novos estudos precisam ser desenvolvidos para melhor elucidar este fato.

Por fim, os fatores imunológicos do hospedeiro foram majoritariamente associados à TF/CR pelos autores. A falta de imunocompetência na mediação de respostas pelas células do hospedeiro foi fortemente associada à TF/CR na Leishmaniose Visceral. Apesar de uma menor quantidade de associações deste fator com a Leishmaniose Cutânea, ele também foi apontado por alguns autores como responsável pelo insucesso no tratamento. A idade dos pacientes também foi ressaltada por muitos autores como um fator de risco, o que se deve muito provavelmente a seus sistemas imunológicos ainda não amadurecidos e, portanto, nem sempre

eficazes na produção de respostas. Em suma, a presença de um sistema imune propenso a falhar em preparar e manifestar uma resposta adequada, seja por quaisquer condições que levem ao imunocomprometimento, foi um elemento preponderante para ocorrência de TF/CR tanto na forma cutânea quanto na forma visceral.

Concluimos com esta revisão que o fenômeno da TF/CR nas Leishmanioses é multifatorial e apresenta peculiaridades intrínsecas a cada tipo de manifestação clínica. Levantamos evidências da existência de fatores de risco associados tanto ao hospedeiro quanto ao agente etiológico da doença e, em especial no caso da Leishmaniose Cutânea, até mesmo acerca da via de administração da droga utilizada. Ainda é observado, contudo, pouca clareza acerca da definição de conceitos de Falhas de Tratamento e Recidivas Clínicas na literatura disponível. Esperamos, com esta revisão, que possamos contribuir para o melhor entendimento da comunidade científica sobre a conceituação dos referidos termos.

Fomento

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA.

Referências

ABADIÁS-GRANADO, I. *et al.* Leishmaniasis cutânea y mucocutânea Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Actas Dermo-Sifiliográficas**. v.112. Issue 7. 2021. p601-618. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33652011/>. Acesso em: 16 de ago. 2022

ABDO, M. G. *et al.* Antimony-resistant *Leishmania donovani* in eastern Sudan: incidence and *in vitro* correlation. **East Mediterr Health J.** 9(4). 2003. p.837-43. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15748080/>. Acesso em: 16 ago. 2022

ABTAHI, M. *et al.* Relationship of Leishmania RNA Virus (LRV) and treatment failure in clinical isolates of *Leishmania major*. **BMC Res Notes**. 13, 126. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32178715/>. Acesso em: 16 ago. 2022

AL-JAWABREH, A. & NASEREDDIN, A. Leishmaniasis Recidivans in a Palestinian Bedouin Child. **Skinmed**, [S.L.], v. 6, n. 5. 2007. p.250-252. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17786107/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

ALIA, D. B. *et al.* Ambisome as first line treatment of a child with ALL associated with the relapse of leishmaniasis. **International Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 21. 2014.

p.298- 298. Disponível em: [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(14\)01096-0/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(14)01096-0/fulltext). Acesso em: 16 ago. 2022.

ALVES, F. *et al.* Recent Development of Visceral Leishmaniasis Treatments: Successes, Pitfalls, and Perspectives. **American Society for Microbiology**. v.31, Issue4. 2018. Disponível em: <https://journals-asm-org.ez14.periodicos.capes.gov.br/doi/epub/10.1128/CMR.00048-18>. Acesso em: 16 ago. 2022

ANTONIOU, M. *et al.* Short report: Treatment failure due to mixed infection by different strains of the parasite *Leishmania infantum*. **Am J Trop Med Hyg**;71(1). 2004. p.71-72. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/71/1/article-p71.xml>. Acesso em: 16 ago. 2022

ARBOLEDA, M. *et al.* Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with intralesional meglumine antimoniate: a case series. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 52. 2019. p.1-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31141044/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

AREVALO, J. *et al.* Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. **J Infect Dis**. 195(12). 2007. p1846-51. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17492601/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

BAMOROVAT, M. *et al.* Major risk factors and histopathological profile of treatment failure, relapse and chronic patients with anthroponotic cutaneous leishmaniasis: a prospective case-control study on treatment outcome and their medical importance. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 15, n. 1. 2021. p.1-23. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0009089>. Acesso em: 16 ago. 2022.

BANSAL, R. *et al.* A Plant like Cytochrome P450 Subfamily CYP710C1 Gene in *Leishmania donovani* Encodes Sterol C-22 Desaturase and its Over-expression Leads to Resistance to Amphotericin B. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 13, n. 4. 2019. p.1-23. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007260>. Acesso em: 16 ago. 2022

BASILE, G. *et al.* Refractory mucocutaneous leishmaniasis resolved with combination treatment based on intravenous pentamidine, oral azole, aerosolized liposomal amphotericin B, and intralesional meglumine antimoniate. **International Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 97. 2020. p.204-207. Disponível em: [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(20\)30438-0/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(20)30438-0/fulltext). Acesso em: 16 ago. 2022.

BOURREAU, E. *et al.* Presence of Leishmania RNA Virus 1 in *Leishmania guyanensis* Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse. **Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 213, n. 1. 2015. p.105-111. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/213/1/105/2459168>. Acesso em: 16 ago. 2022.

CAMPOS, M. A. G. *et al.* Is splenectomy an option for multiple relapses in a child with visceral leishmaniasis? A case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 54. 2021. p. 1-3. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/9CwNLDt4dxHYrpHPP55zjqb/?lang=en>. Acesso em: 16 ago. 2022.

CANTANHÊDE L. M. *et al.* Further Evidence of an Association between the Presence of *Leishmania RNA Virus 1* and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. **PLoS Negl Trop Dis.**, 9(9). 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004079>. Acesso em: 16 ago. 2022.

CARNIELLI, J. B. T. *et al.* A *Leishmania infantum* genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. **Ebiomedicine**, [S.L.], v. 36. 2018. p.83-91. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964\(18\)30387-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964(18)30387-6/fulltext). Acesso em: 16 ago. 2022.

CASADO, J. L. *et al.* Relapsing Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected Patients Undergoing Successful Protease Inhibitor Therapy. **European Journal Of Clinical Microbiology And Infections Diseases**, [S.L.], v. 20, n. 3. 2001. p.202-205. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s100960100457>. Acesso em: 16 ago. 2022.

CASTRO, A. *et al.* Lymphoproliferative response after stimulation with soluble leishmania antigen (SLA) as a predictor of visceral leishmaniasis (VL) relapse in HIV+ patients. **Acta Tropica**, [S.L.], v.164. 2016. p.345-351. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X16302911?via%3Dihub>. Acesso em: 2022.

CASTRO, M. M. *et al.* Risk factors for therapeutic failure to meglumine antimoniate and miltefosine in adults and children with cutaneous leishmaniasis in Colombia: a cohort study. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v.11, n.4. 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005515>. Acesso em: 16 ago. 2022.

CHALCO-AGUATE, M. *et al.* Falla terapéutica y hepatotoxicidad de los esquemas de tratamiento endovenoso e intramuscular con estibogluconato de sodio en pacientes con leishmaniasis cutánea / Therapeutic failure and hepatotoxicity with schemes intravenous and intramuscular sodium stibogluconate treatment in patients with cutaneous leishmaniasis. **Dermatol. Peru**, S.I., v. 24, n. 3. 2014. p.153-158. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-765241>. Acesso em: 16 ago. 2022.

CHAKRAVARTY, J. & SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, 20:10, 1251-1265. 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14656566.2019.1609940>. Acesso em: 16 ago. 2022.

CHRISTEN, J. R. *et al.* Use of the intramuscular route to administer pentamidine isethionate in *Leishmania guyanensis* cutaneous leishmaniasis increases the risk of treatment failure. **Travel Medicine And Infectious Disease**, [S.L.], v. 24. 2018. p. 31-36. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1477893918300401?via%3Dihub>. Acesso em: 16 ago. 2022.

CLOOTS, K. *et al.* Male predominance in reported Visceral Leishmaniasis cases: nature or nurture? a comparison of population-based with health facility-reported data. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 14, n. 1. 2020. p.1-14. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007995>. Acesso em: 16 ago. 2021.

CIPRIANO, P. *et al.* Leishmaniose Visceral em Doentes com Infecção VIH: o desafio da recaída e falência terapêutica. **Acta Médica Portuguesa**, [S.L.], v.30, n.6. 2017. p.443-448. Disponível em: <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/8291>. Acesso em: 16 ago. 2022.

DARCIS, G. *et al.* Recurrence of visceral and muco-cutaneous leishmaniasis in a patient under immunosuppressive therapy. **Bmc Infectious Diseases**, [S.L.], v. 17, n. 1. 2017. p.1-4. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2571-x>. Acesso em: 16 ago. 2022.

DAS, V. N. *et al.* Magnitude of unresponsiveness to sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Bihar. **Natl Med J India**. v.18. n.3. 2005. p.131-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16130613/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

DEEP, D. K. *et al.* Increased miltefosine tolerance in clinical isolates of *Leishmania donovani* is associated with reduced drug accumulation, increased infectivity and resistance to oxidative stress. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 11, n. 6. 2017. p.1-16. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005641>. Acesso em: 16 ago. 2022.

DEREURE, J. *et al.* Visceral leishmaniasis. Persistence of parasites in lymph nodes after clinical cure. **Journal Of Infection**, [S.L.], v. 47, n. 1. 2003. p.77-81. Disponível em: [https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(03\)00002-1/fulltext](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(03)00002-1/fulltext). Acesso em: 16 ago. 2022

EICHENBERGER, A. *et al.* A severe case of visceral leishmaniasis and liposomal amphotericin B treatment failure in an immunosuppressed patient 15 years after exposure. **Bmc Infectious Diseases**, [S.L.], v. 17, n. 1. 2017. p.1-5. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2192-4>. Acesso em: 16 ago. 2022.

EKIZ, O. *et al.* Leishmaniasis recidiva cutis of the lips mimicking granulomatous cheilitis. **Indian J Dermatol**, [s. l], v. 60, n. 2. 2015. p. 1-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25814756/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

ELMEKKI, M. A. *et al.* Elevated TGF-beta levels in drug-resistant visceral leishmaniasis. **Annals Of Saudi Medicine**, [S.L.], v.36, n.1. 2016. p.73-77. Disponível em: <https://www.annsaudimed.net/doi/10.5144/0256-4947.2016.73>. Acesso em: 16 ago. 2022.

ESCOLÁN, K. P.; RIVERA, M. & ALGER, J. Falla terapéutica del antimonio de meglumina en el tratamiento de la leishmaniasis visceral Informe de un caso. **Rev Med Hondur**, [s. l], v. 73, n. 04. 2005. p.172-178. Disponível em:

<https://revistamedicahondurena.hn/assets/Uploads/Vol173-4-2005-6.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2022.

ESPADA, C. R. *et al.* Ros3 (Lem3p/CDC50) Gene Dosage Is Implicated in Miltefosine Susceptibility in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Clinical Isolates and in *Leishmania (Leishmania) major*. **Acs Infectious Diseases**, [S.L.], v. 7, n. 4. 2021. p.849-858. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00857>. Acesso em: 16 ago. 2022.

FRANSSEN, S. U. *et al.* Diversity and Within-Host Evolution of *Leishmania donovani* from Visceral Leishmaniasis Patients with and without HIV Coinfection in Northern Ethiopia. **Mbio**, [S.L.], v. 12, n. 3. 2021. p.1-19. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00971-21>. Acesso em: 16 ago. 2022.

FREITAS, J. J. A. *et al.* Tratamento de Recidiva de Leishmaniose Visceral em Criança com Terapia Tripla: relato de caso. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 25. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867020303330?via%3Dihub>. Acesso em: 16 ago. 2022.

FRÉZARD, F. *et al.* Glutathione induced conversion of 3-pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrob Agents Chemoter.** 45. 2001. p.913- 916. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11181379/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

GARCIA M, *et al.* Changes in the infectivity, pyruvate kinase activity, acid phosphatase activity and P-glycoprotein expression in glibenclamide-resistant *Leishmania mexicana*. **Parasitology research.** 86. 2000. p.899-904. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11097297/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

GANGNEUX, J. P. *et al.* Recurrent American cutaneous leishmaniasis. **Emerging Infectious Diseases**, S.I., v. 13, n. 9, 2007. p.1436-1438. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2857276/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

GITARI, J. W. *et al.* Leishmaniasis recidivans by *Leishmania tropica* in Central Rift Valley Region in Kenya. **International Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 74. 2018. p.109-116. Disponível em: [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(18\)34466-7/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(18)34466-7/fulltext). Acesso em: 16 ago. 2022.

GOMES, C. M. *et al.* Recurrent cutaneous leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 88, n. 3. 2013. p.462-464. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/ZGJgBQQvLL58M5rNV5hJdrD/?lang=en>. Acesso em: 16 ago. 2022.

GOYAL, V. *et al.* Long-term incidence of relapse and post-kala-azar dermal leishmaniasis after three different visceral leishmaniasis treatment regimens in Bihar, India. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 14, n. 7. 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0008429>. Acesso em: 16 ago. 2022.

GRIENSVEN, J. V. & DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Elsevier**. Volume 33, Issue 1, 2019. p. 79-99. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891552018300928?via%3Dihub>. Acesso em: 16 ago. 2022.

GUERRA-SILVEIRA, F. & ABAD-FRANCH, F. Sex Bias in Infectious Disease Epidemiology: Patterns and Processes. **PLoS ONE** 8(4). 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0062390>. Acesso em: 16 ago. 2022.

HADIGHI, R. *et al.* Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. **PLoS Med** 3(5). 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1435779/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

HARTLEY, A. M. *et al.* Leishmania RNA virus: when the host pays the toll. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22919688/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

IVES, A. *et al.* Leishmania RNA Virus Controls the Severity of Mucocutaneous Leishmaniasis. **Science**, [S.L.], v. 331, n. 6018. 2011. p. 775-778. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1199326>. Acesso em: 16 ago. 2022.

JEDDI, F. *et al.* Heterogeneity of Molecular Resistance Patterns in Antimony-Resistant Field Isolates of *Leishmania* Species from the Western Mediterranean Area. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.58. n.8. 2014. p. 4866 – 4874. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24913173/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

JEZIORSKI, E. *et al.* Mucosal relapse of visceral leishmaniasis in a child treated with anti-TNF α . **International Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v.33. 2015. p.135-136. Disponível em: [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(14\)01754-8/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(14)01754-8/fulltext). Acesso em: 16 ago. 2022.

KARAMIAN, M. *et al.* Effectiveness of meglumine antimoniate against *L. tropica* in a recently emerged focus of cutaneous leishmaniasis in Birjand, eastern Islamic Republic of Iran. **Eastern Mediterranean Health Journal**. v21. n4. 2015. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255104/EMHJ_2015_21_4_280_286.pdf?sequence=2&isAllowed=y. Acesso em: 16 ago. 2022.

KOSAKA, A. *et al.* Failure of Liposomal-amphotericin B Treatment for New World Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. **Internal Medicine**, [S.L.], v. 59, n. 9. 2020. p.1227-1230. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/59/9/59_4096-19/_article. Acesso em: 16 ago. 2022.

LEÓN, A. F. *et al.* Cuantificación de niveles de INF- γ - IL-13 y células T CD4+, CD8+ en pacientes con leishmaniasis tegumentaria con falla terapéutica. **Gaceta Médica Boliviana**, S.I., v.36, n.1. 2013. p.15-20. Disponível em: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662013000100004. Acesso em: 16 ago. 2022.

LIRA, R. *et al.* Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. **J Infect Dis.** 180(2). 1999. p.564-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10395884/> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10395884/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

LLANOS-CUENTAS, A. *et al.* Clinical and Parasite Species Risk Factors for Pentavalent Antimonial Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis in Peru. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 46, n. 2. 2008. p.223-231. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/46/2/223/455584>. Acesso em: 16 ago. 2022.

LOCKARD, R. D.; WILSON, M. E. & RODRÍGUEZ, N. E. Sex-Related Differences in Immune Response and Symptomatic Manifestations to Infection with *Leishmania* Species. **Journal Of Immunology Research**, [S.L.]. 2019, p. 1-14. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2019/4103819/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

MACHUCA, C. *et al.* *Leishmania amazonensis*: metabolic adaptations induced by resistance to an abc transporter blocker. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 114, n. 1. 2006. p.1-9. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S001448940600035X?via%3Dihub>. Acesso em: 16 ago. 2022.

MAROVICH, M. A. *et al.* Leishmaniasis Recidivans Recurrence after 43 Years: a clinical and immunologic report after successful treatment. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v.33, n. 7. 2001. p.1076-1079. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/33/7/1076/431118>. Acesso em: 16 ago. 2022.

MCGWIRE, B. & SATOSKAR, A. R. Opções de tratamento para leishmaniose. **Current Clinical Microbiology Reports**, 3, 2016. p198–203. Disponível em: <https://doi-org.ez14.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s40588-016-0048-0>. Acesso em: 16 ago. 2022.

MENDONÇA, M. G. *et al.* Persistence of *Leishmania* Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: is there a sterile cure?. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v.189, n.6. 2004. p.1018-1023. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/189/6/1018/873128>. Acesso em: 16 ago. 2022.

MOHAMMED, R. *et al.* Multiple Relapses of Visceral Leishmaniasis in HIV Co-Infected Patients: a case series from ethiopia. **Current Therapeutic Research**, [S.L.], v. 92. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011393X20300096?via%3Dihub>. Acesso em: 16 ago. 2022.

MONTE-NETO, R. L. *et al.* Gene Expression Profiling and Molecular Characterization of Antimony Resistance in *Leishmania amazonensis*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v.5, n.5. 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001167>. Acesso em: 16 ago. 2022.

MORIZOT, G. *et al.* Antimony to Cure Visceral Leishmaniasis Unresponsive to Liposomal Amphotericin B. **PLoS Negl Trop Dis.** 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26735920/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

OBONAGA, R. *et al.* Treatment Failure and Miltefosine Susceptibility in Dermal Leishmaniasis Caused by Leishmania Subgenus *Viannia* Species. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v.58, n.1. 2014. p.144-152. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01023-13>. Acesso em: 16 ago. 2022.

OSATAKUL, S. Recurrences of Visceral Leishmaniasis Caused by Leishmania siamensis after Treatment with Amphotericin B in a Seronegative Child, **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 90(1), 2014. p.40-42. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/90/1/article-p40.xml>. Acesso em: 16 ago. 2022.

OSTYN, B. *et al.* Failure of Miltefosine Treatment for Visceral Leishmaniasis in Children and Men in South-East Asia. **Plos One**, [S.L.], v.9, n.6. 2014. p.1-8. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0100220>. Acesso em: 16 ago. 2022.

OUAKAD, M. *et al.* Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. **Parasitology**, [S.L.], v.138, n.11. 2011. p1392-1399. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/increased-metacyclogenesis-of-antimony-resistant-leishmania-donovani-clinical-lines/54B5D2758478AE1289E4BCD993E663CD>. Acesso em: 16 ago. 2022.

PALUMBO, E. Estratégias de tratamento para leishmaniose mucocutânea. **Journal of Global Infectious Diseases**. v.2. Ed.2. 2010. p.147-150. Disponível em: <https://www.jgid.org/text.asp?2010/2/2/147/62879>. Acesso em: 16 ago. 2022.

PANDEY, B. D. *et al.* Relapse of visceral leishmaniasis after miltefosine treatment in a Nepalese patient. **Am J Trop Med Hyg**. 80(4). 2009. p.580-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19346379/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

PASQUAU, F. *et al.* Leishmaniasis as an opportunistic infection in HIV-infected patients: determinants of relapse and mortality in a collaborative study of 228 episodes in a mediterranean region. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [S.L.], v. 24, n. 6, 2005. p.411-418. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-005-1342-6>. Acesso em: 16 ago 2022.

PATOLE, S; BURZA, S. & VARGHESE, G. M. Multiple relapses of visceral leishmaniasis in a patient with HIV in India: a treatment challenge. **International Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 25. 2014. p.204-206. Disponível em: [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(14\)01453-2/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(14)01453-2/fulltext). Acesso em: 16 ago. 2022.

PEREIRA, M. D; LOPES, J. D. & NEVES, M. G. C. Leishmaniose Visceral em criança: um relato de caso sobre a recidiva da doença. **Com. Ciências Saúde**, [s. l], v. 26, n. 3/4. 2015. p.145-150. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-996943>. Acesso em: 16 ago. 2022.

PONTE-SUCRE, A. *et al.* Sensitivity of *Leishmania* spp. to Glibenclamide and 4-Aminopiridine: A Tool for the Study of Drug Resistance Development. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.5, n.92. 1997. p.601-606. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/mioc/a/8XZBbmtLTJCV64LvMRv6kCb/?lang=en>. Acesso em: 16 ago. 2022.

PONTE-SUCRE, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v.11, n.12, 2017. p.1-24. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006052>. Acesso em: 16 ago. 2022.

PRATA, A. *et al.* Eficácia da azitromicina no tratamento da leishmaniose cutânea. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical [online]**. v.36, n.1. 2003. p.65-69. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/hy66VgLTrjZpNMJPDXYH7Pz/abstract/?lang=en>. Acesso em: 16 ago. 2022.

PURKAIT, B. *et al.* Mechanism of Amphotericin B Resistance in Clinical Isolates of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v.56, n.2. 2012. p. 1031-1041. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00030-11>. Acesso em: 16 ago. 2022.

REINALDO, L. G. C. *et al.* Recurrent kala-azar: report of two cured cases after total splenectomy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.L.], v.62. 2020. p.1-4. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimts/a/bZ5M9x5Nk4gW9xs7K4GQFbn/?lang=en>. Acesso em: 16 ago. 2022.

RIJAL, S. *et al.* Increasing Failure of Miltefosine in the Treatment of Kala-azar in Nepal and the Potential Role of Parasite Drug Resistance, Reinfection, or Noncompliance. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v.56, n.11. 2013. p.1530-1538. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/56/11/1530/302997>. Acesso em: 16 ago. 2022.

RODRIGUES, A. M. *et al.* Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, [S.L.]**, v.39, n.2. 2006. p.139-145. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/FrqnnnbP6TcG8RjdMvTBkm/?lang=pt>. Acesso em: 16 ago. 2022.

ROMERO, G. A. S. *et al.* Comparison of Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in brazil: therapeutic response to Meglumine Antimoniate. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 65(5). 2001. p.456-465. Disponível em: https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/65/5/article-p456.xml?tab_body=pdf. Acesso em: 16 ago. 2022

RUIZ-POSTIGO, J. A. *et al.* "Global leishmaniasis surveillance: 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap/Surveillance mondiale de la leishmaniose: 2019-2020, une periode de reference pour la feuille de route a l'horizon 2030." **Weekly Epidemiological Record**, vol. 96, no. 35, 3 Sept. 2021, pp. 401+. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9635-401-419>. Acesso em: 16 ago. 2022.

RUIZ-VILLAVERDE, R. *et al.* Leishmaniasis cutânea crônica: resposta a n-metil glucamina intralesional tras fracaso con paramomicina tópica. **Actas Dermo-Sifiliogr.**, [s. l], v. 4, n. 93. 2002. p.263-266. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001731002765708>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SCHEFFTER, S. *et al.* The complete sequence of Leishmania RNA virus LRV2-1, a virus of an Old World parasite strain. **Virology**. v.212, 1995. p84–90. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682285714560?via%3Dihub>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SIMÃO, J. C.; VICTÓRIA, C. & FORTALEZA, C. M. C. B. Predictors of relapse of visceral leishmaniasis in inner São Paulo State, Brazil. **International Journal Of Infectious Diseases, [S.L.]**, v. 95. 2020. p. 44-49. Disponível em: [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(20\)30086-2/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(20)30086-2/fulltext). Acesso em: 16 ago. 2022.

SINGH, N; SINGH, R. T. & SUNDAR, S. Novel Mechanism of Drug Resistance in Kala Azar Field Isolates. **The Journal Of Infectious Diseases, [S.L.]**, v.188, n.4, 2003. p.600-607. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/188/4/600/875553>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SOARES, G. H. C. *et al.* Case Report: coinfection by *leishmania amazonensis* and hiv in a brazilian diffuse cutaneous leishmaniasis patient. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene, [S.L.]**, v.103, n.3. 2020. p.1076-1080. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/103/3/article-p1076.xml>. Acesso em: 16 ago. 2022

STEFANIDOU, M. P. *et al.* A rare case of leishmaniasis recidiva cutis evolving for 31 years caused by *Leishmania tropica*. **International Journal Of Dermatology, [S.L.]**, v.47, n.6. 2008. p.588-589. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-4632.2008.03240.x>. Acesso em: 16 ago. 2022.

TROYA, J. *et al.* Long term failure of miltefosine in the treatment of refractory visceral leishmaniasis in AIDS patients. **Scandinavian Journal Of Infectious Diseases, [S.L.]**, v. 40, n. 1. 2008. p.78-80. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00365540701466215>. Acesso em: 16 de ago. 2022.

TUON, F. F. *et al.* Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. **Clinical Immunology, [S.L.]**, v.128, n.3. 2008. p.442-446. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S152166160800675X?via%3Dihub>. Acesso em: 16 ago. 2022

TURNER, K. G. *et al.* Fitness and Phenotypic Characterization of Miltefosine-Resistant *Leishmania major*. **Plos Neglected Tropical Diseases, [S.L.]**, v.9, n.7. 2015. p.1-15. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003948>. Acesso em: 16 ago. 2022.

VANAERSCHOT, M. *et al.* Antimonial Resistance in *Leishmania donovani* Is Associated with Increased *In Vivo* Parasite Burden. **PLoS ONE** 6(8). 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21829701/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

VANAERSCHOT, M. *et al.* Treatment failure in leishmaniasis: drug-resistance or another (epi-) phenotype?. **Expert Review Of Anti-Infective Therapy**, [S.L.], v.12, n.8, p.937- 946, 2014. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14787210.2014.916614>. Acesso em: 16 ago. 2022.

VÉLEZ, I. D; COLMENARES, L. M. & MUÑOZ, C. A. Two cases of visceral leishmaniasis in Colombia resistant to meglumine antimonial treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.L.], v.51, n.4. 2009. p.231-236. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimts/a/JTXXcZKnSsTw6CwShDrBDtF/?lang=en>. Acesso em: 16 ago. 2022.

VIEIRA-GONÇALVES, R. *et al.* First report of treatment failure in a patient with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) naiffi* carrying Leishmania RNA virus: a fortuitous combination?. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 52. 2019. p. 1-3. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/BvRYNgcTxcwNGXp696wy3c/?lang=en>. Acesso em: 16 ago. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 16 ago. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Technical Report Series 949. **Control of the leishmaniases**: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf;jsessionid=528A345D021696FAE84536A9CFE1FDF6?sequence=1. Acesso em: 16 ago. 2022.

WHO. Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2020 [Internet]. 2020a. Disponível em: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/2021-dha-docs/leishmaniasis_vl_2020.pdf?sfvrsn=17eea7b2_7. Acesso em: 16 ago. 2022.

WHO. Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2020 [Internet]. 2020b. Disponível em: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/2021-dha-docs/leishmaniasis_cl_2020.pdf?sfvrsn=716850a8_9. Acesso em: 16 ago. 2022.

WHO. Control of Neglected Tropical Diseases. **Indicators for monitoring and evaluation of the kala-azar elimination programme (India, Nepal and Bangladesh)**. 2010. Disponível em; <https://www.who.int/publications/i/item/9789241500371>. Acesso em: 16 ago. 2022.

WHO. **Manual on Case Management and Surveillance of the Leishmaniases in the Who European Region**. 2017. Disponível em: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/341970/MANUAL-ON-CASE-MANAGEMENT_FINAL_with-cover-and-ISBN.pdf. Acesso em: 16 ago. 2022.

WHO. Pan American Health Organization. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/50524>. Acesso em: 16 ago. 2022.

WHO. Regional Office for the Eastern Mediterranean. **Manual for case management of cutaneous leishmaniasis in the WHO Eastern Mediterranean Region**. 2014. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/120002>. Acesso em: 16 ago. 2022.

WHO. Republic of the Sudan. Federal Ministry of Health Communicable and Non-Communicable. Diseases Control Directorate. **Manual for the diagnosis and treatment of Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.humanitarianresponse.info/sites/www.humanitarianresponse.info/files/2019/07/Manual-for-the-diagnosis-%26-treatment-of-leishmaniasis-%282%29.pdf>. Acesso em:

FIGURAS:

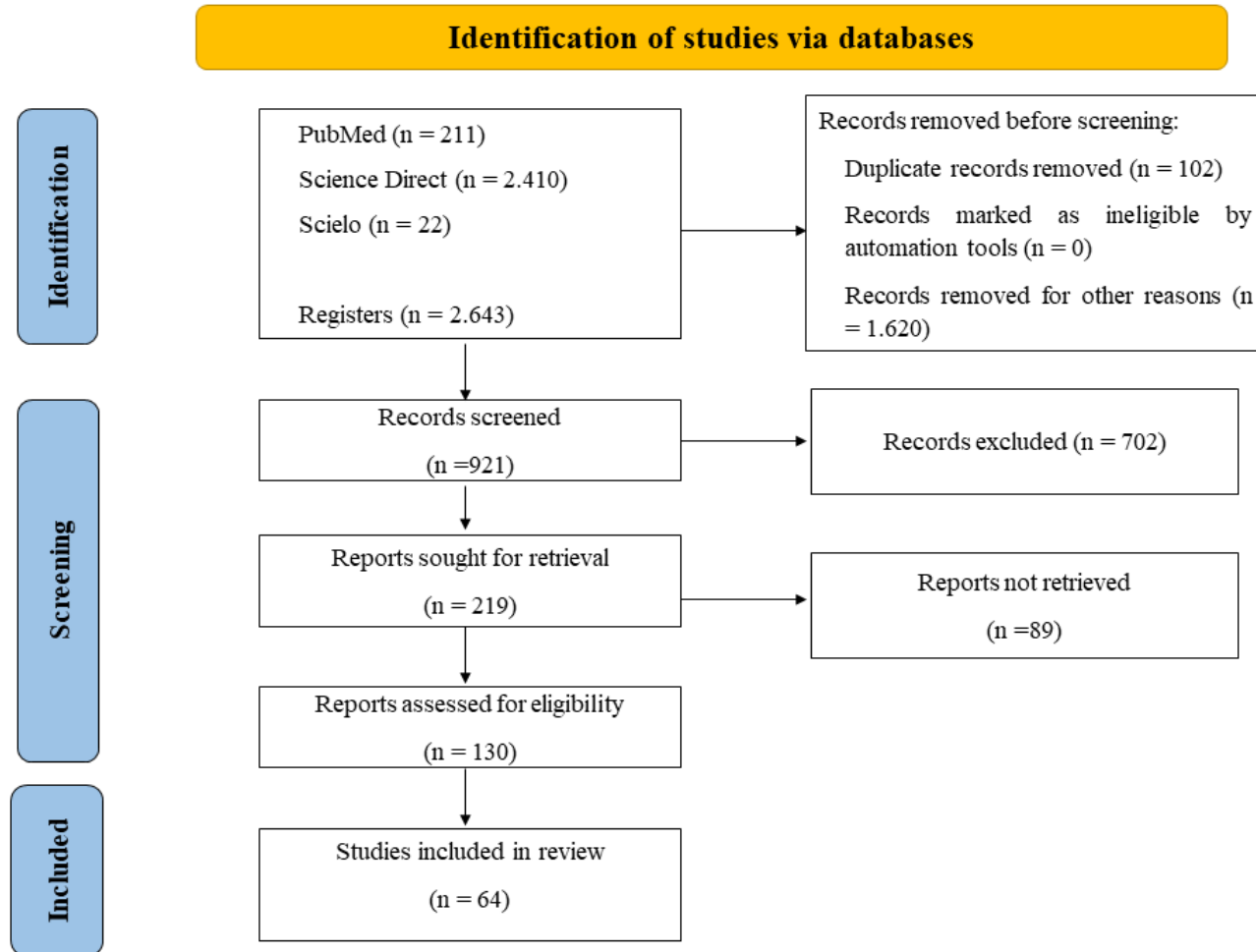


Figure 1: flowchart of searches performed following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) method.

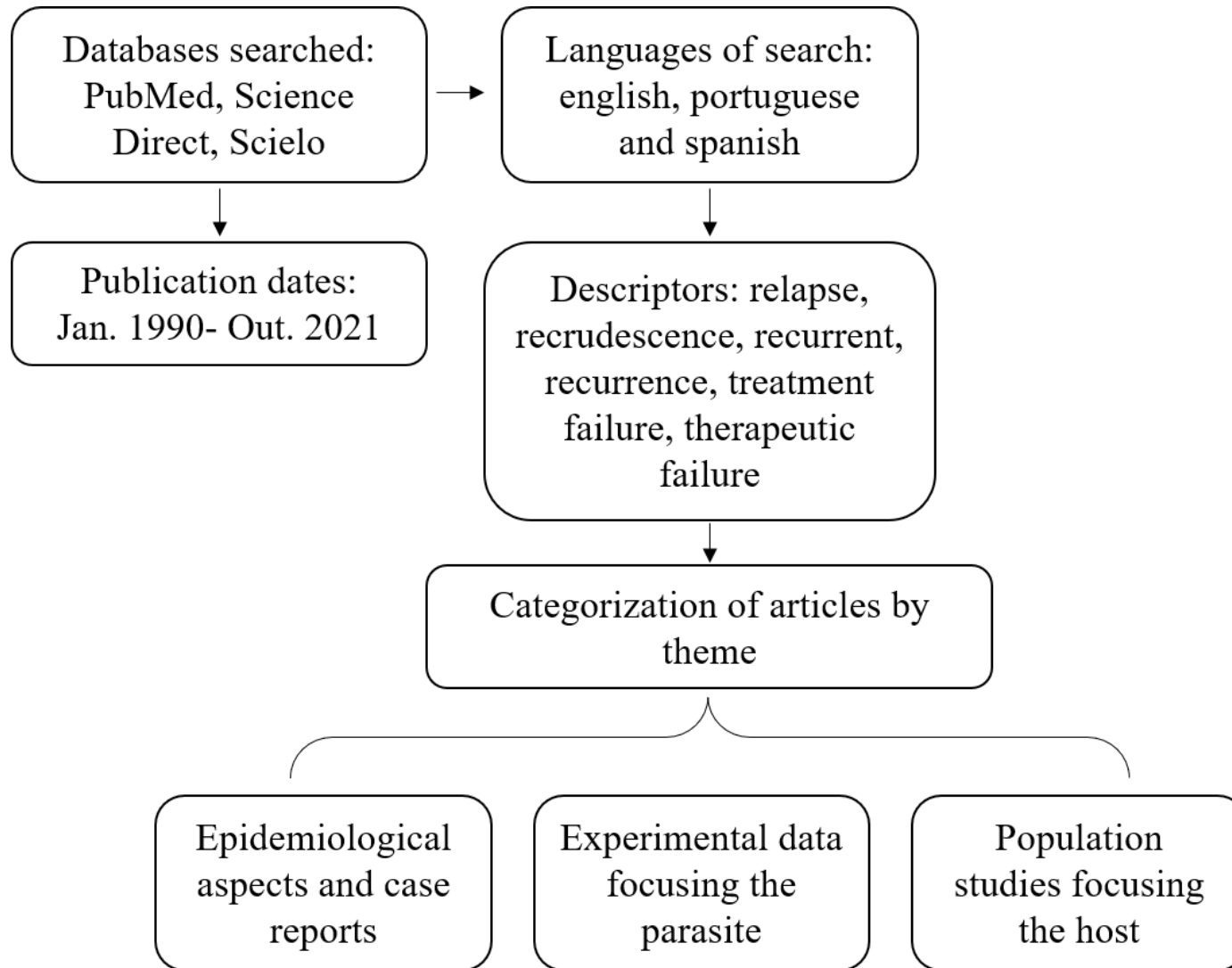


Figure 2: Schematic diagram of the methodology used to search and categorize the articles found.

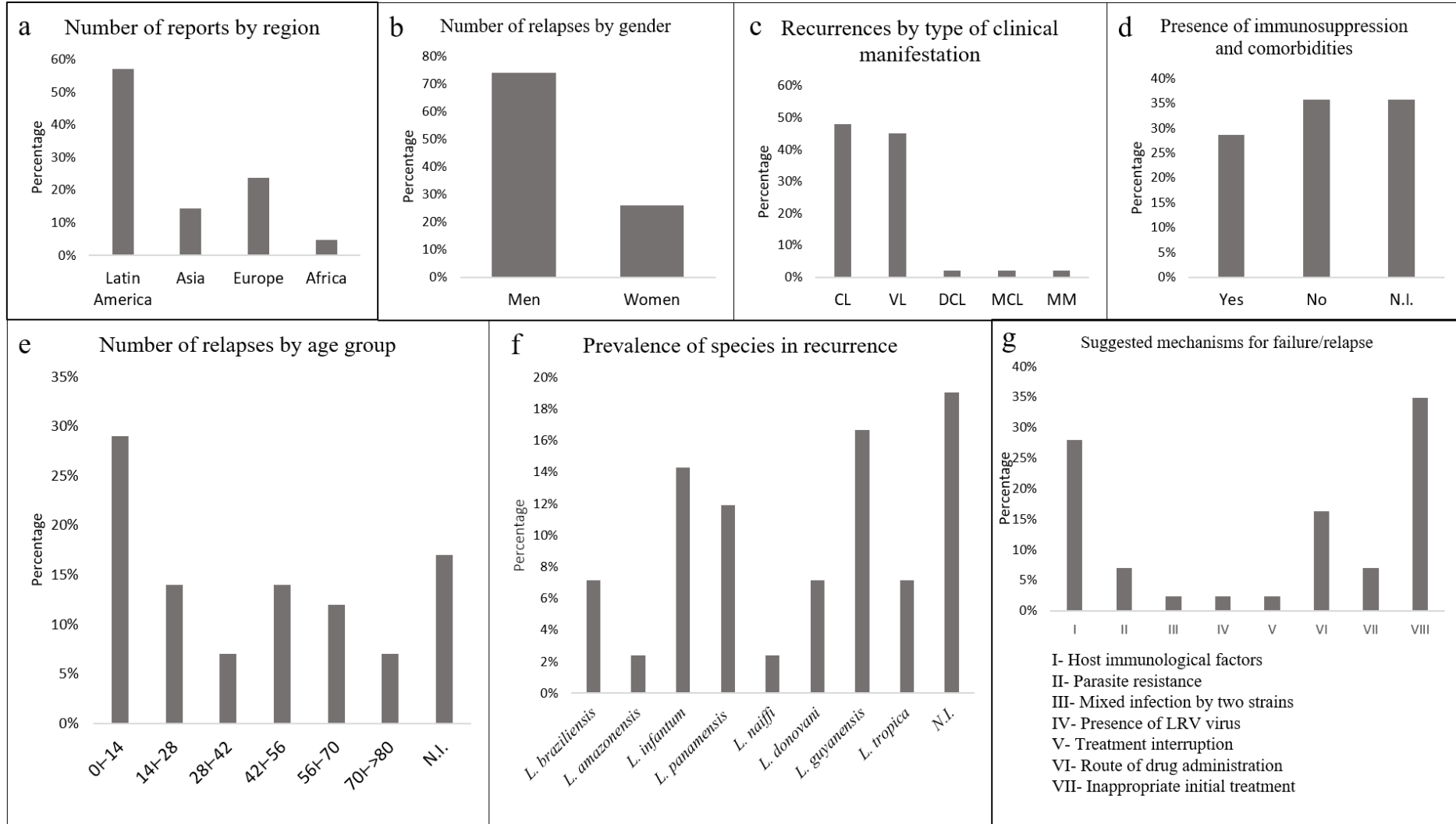


Figure 3: chart with data collected from all articles classified as case reports

TABELAS:**Table 1.** Concepts of Non-Response, Clinical Relapse and Therapeutic Failure according to the World Health Organization manuals

Source document		Clinical Relapse	Treatment failure
Indicators for monitoring and evaluation of the kala-azar elimination programme (India, Nepal and Bangladesh)	VL	any reappearance of signs and symptoms within a period of six months after the end of treatment	non-response or relapse cases or death
	CL	-	-
Manual on Case Management and Surveillance of the Leishmaniases in the Who European Region	VL	a patient who experiences recurrence of VL symptoms with parasitological confirmation at any time after initial cure	-
	CL	reappearance of lesion(s) after cure with parasitological confirmation	-
Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas	VL	recrudescence of symptoms, within 12 months after clinical cure	no clinical remission of the patient, after having received two regimens of the same medication, performed on a regular basis
	CL	the reactivation of a healer regardless of observation time	when there is no clinical cure after the complete treatment evaluated in 3 months
	VL	-	-

Manual for case management of cutaneous leishmaniasis in the WHO Eastern Mediterranean Region	CL	reappearance of a nodule, plaque or ulceration after cure. Parasitological confirmation only in complex cases	increase of a nodule, plaque or ulceration within 14 days of treatment, or lack of complete re-epithelialization within 45 days of treatment starting
Manual for the Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis (Republic of the Sudan)	VL	a patient with clinically and parasitologically confirmed VL after successful treatment of VL. A person who has VL more than once is considered to have a relapse rather than reinfection	a positive parasitological test and persisting clinical signs/symptoms. There are two types: slow-responders and non-responders
	CL	-	-

VL: Visceral Leishmaniasis; CL: Cutaneous Leishmaniasis

Table 2. Data collected from articles categorized as "Experimental with a focus on the parasite"

Year/ Author	Article origin	<i>Leishmania specie</i>	Clinical form	Drugs	Reference strains and/or clinical isolates	Pro	Ama	Experimental model used	Possible mechanisms for parasites sensitivity alterations
Arevalo <i>et al.</i> (2007)	Peru	<i>L. peruviana, L. guyanensis, L. braziliensis, L. lainsoni e L. mexicana</i>	CL	Sb ^v	RS/CI	Yes	Yes	Molecular parasite identification/ characterization Molecular parasite identification/ characterization	Natural interspecific variation
Abdo <i>et al.</i> (2003)	Sudan	<i>L. donovani</i>	VL	Sb ^v	RS/CI	Yes	Yes	<i>In vitro/in vivo</i> sensitivity testing and Molecular parasite identification/ characterization	Factors associated with altered DNA or gene expression level
Abtahi <i>et al.</i> (2020)	Iran	<i>L. major</i>	CL	Sb ^v	CI	No	No	Molecular parasite identification/ characterization	Factors associated with altered DNA or gene expression level
Machuca <i>et al.</i> (2006)	Venezuela	<i>L. amazonensis</i>	CL	GLIB	RS/CI	Yes	No	Functional assay	Factors associated with altered DNA or gene expression level, altered biochemical pathways, and Presence of virus infection
Espada <i>et al.</i> (2021)	Brazil	<i>L. braziliensis e L. major</i>	CL	MIL	RS/CI	Yes	Yes	<i>In vitro/in vivo</i> sensitivity assays, parasite gene assays and functional assays	Factors associated with altered DNA or gene expression level
Monte-Neto <i>et al.</i> (2011)	Brazil	<i>L. amazonensis</i>	CL	Sb ^{III}	RS/CI	Yes	No	<i>In vitro/in vivo</i> Sensitivity Assay and Gene Assays on the parasite	Factors associated with altered DNA or gene expression level
Ponte-Sucre <i>et al.</i> (1997)	Venezuela	<i>L. mexicana, L. amazonensis, L. major, L. brasiliensis e L. guyanensis</i>	LCD	GLIB	RS/CI	Yes	No	Gene assays in the parasite and Molecular parasite identification/ characterization	Factors associated with altered DNA or gene expression level
Garcia <i>et al.</i> (2000)	Venezuela	<i>L. mexicana</i>	LCD	GLIB	RS/CI	Yes	Yes	Parasite Gene Assays and Functional Assays	Factors associated with alterations in DNA or gene expression level, Factors associated with virulence, and Alterations in biochemical pathways
Turner <i>et al.</i> (2015)	United States	<i>L. major</i>	CL	MIL	RS/CI	Yes	Yes	<i>In vitro/in vivo</i> sensitivity testing, gene assays on the parasite and Molecular parasite identification/ characterization	Factors associated with changes in DNA or gene expression level and Changes in the rate of metacyclogenesis

Vanaerschot <i>et al.</i> (2011)	Nepal and Belgium	<i>L. donovani</i>	VL	Sb ^V	RS/CI	Yes	Yes	<i>In vitro/in vivo</i> sensitivity testing and Molecular parasite identification/ characterization	Altered immune response mediation and virulence-associated factors
Ouakad <i>et al.</i> (2011)	Nepal, India and Belgium	<i>L. donovani</i>	VL	Sb ^V	CI	Yes	Yes	Gene assays in the parasite and Molecular parasite identification/ characterization	Changes in the rate of metacyclogenesis
Deep <i>et al.</i> (2017)	India	<i>L. donovani</i>	VL and PKDL	MIL	RS/CI	Yes	Yes	<i>In vitro/in vivo</i> sensitivity testing, parasite gene assays, functional assays and Molecular parasite identification/ characterization	Factors associated with virulence, alterations in biochemical pathways and alterations in the rate of metacyclogenesis
Obonaga <i>et al.</i> (2014)	Colombia	<i>L. braziliensis e L. panamensis</i>	CL	MIL	RS/CI	Yes	Yes	<i>In vitro/in vivo</i> sensitivity testing, gene assays on the parasite and Molecular parasite identification/ characterization	Factors associated with altered DNA or gene expression level
Hadighi <i>et al.</i> (2006)	Iran	<i>L. tropica e L. major</i>	CL	Sb ^V	CI	Yes	Yes	<i>In vitro/in vivo</i> sensitivity testing, gene assays on the parasite and Molecular parasite identification/ characterization	Changes in biochemical pathways
Purkait <i>et al.</i> (2012)	India	<i>L. donovani</i>	VL	AmB	CI	Yes	Yes	<i>In vitro/in vivo</i> sensitivity testing, parasite gene assays, functional assays and Molecular parasite identification/ characterization	Factors associated with altered DNA or gene expression level and altered biochemical pathways
Singh, Singh e Sundar (2003)	Índia	<i>L. donovani e L. amazonensis</i>	VL	Sb ^V	CI	Yes	Yes	<i>In vitro/in vivo</i> Sensitivity Assay and Gene Assays on the parasite	Factors associated with altered DNA or gene expression level and altered biochemical pathways
Lira <i>et al.</i> (1999)	Índia	<i>L. donovani</i>	VL	Sb ^V	CI	Yes	Yes	<i>In vitro/in vivo</i> sensitivity testing and Molecular parasite identification/ characterization	Specific stage response variation
Jeddi <i>et al.</i> (2014)	Algeria, Tunisia and France	<i>L. infantum, L. major e L. killicki</i>	CL and VL	Sb ^V	CI	Yes	Yes	<i>In vitro/in vivo</i> sensitivity testing, gene assays on the parasite and Molecular parasite identification/ characterization	Factors associated with altered DNA or gene expression level
Carnielli <i>et al.</i> (2018)	Brazil	<i>L. infantum</i>	VL	MIL	RS/CI	Yes	No	Gene assays in the parasite	Factors associated with altered DNA or gene expression level

PRO: Promastigotas; AMA: Amastigotas; CL: Cutaneous Leishmaniasis; VL: Visceral Leishmaniasis; LCD: Tegumentary diffuse leishmaniasis; PKDL: Post-Kalazar Dermal Leishmaniasis; Sb^V: Pentavalent Antimony; Sb^{III}: Trivalent Antimony; GLI: Glibenclamide; MIL: Miltefosine; AMB: Amphotericin B; RS: Reference Strain; CI: Clinical Isolate.

Table 3. Data collected from articles categorized as "Host-focused population studies"

Year/ Author	Article Origin	<i>Leishmania</i> species	Clinical form	Drugs	Number of patients	Age group	Sex	Treatment Failure	Clinical Relapse	HIV coinfection	Study methodology	Risk factors associated with TF/CR
Rodrigues <i>et al.</i> (2006)	Brazil	Not specified	CL	GLU	151	01-69	M: 131 F: 20	Yes (47%)	No	N.I.	Retrospective cohort study	Clinical
Castro <i>et al.</i> (2017)	Colombia	<i>L. panamensis</i> , <i>L. braziliensis</i> and <i>L. guyanensis</i>	CL	GLU and MIL	230	02-60	M: 135 F: 95	Yes (15,65%)	No	N.I.	Retrospective cohort study	Clinicians and therapeutic regimen
Llanos-Cuentas <i>et al.</i> (2008)	Peru	<i>L. peruviana</i> , <i>L. braziliensis</i> and <i>L. guyanensis</i>	CL	SS	119	07-33	M: 73 F: 46	Yes (24,4%)	No	N.I.	Case control	Clinical and Epidemiological
León <i>et al.</i> (2013)	Bolivia	N.I.	CL	Antimonial	30	N.I.	N.I.	Yes (33,33%)	No	N.I.	Immunological investigation	Immunological
Tuon <i>et al.</i> (2008)	Brazil	N.I.	MCL	GLU and PENT	16	21-80	M: 11 F: 5	No	Yes (50%)	No	Prospective cohort study/immunological investigation	Immunological
Chalco-Aguate <i>et al.</i> (2014)	Peru	<i>L. braziliensis</i> and <i>L. guyanensis</i>	CL	SS	64	mean=20.5	M: 64 F: 0	Yes (51,6%)	No	No	Retrospective cohort study	Route of drug administration
Cipriano <i>et al.</i> (2017)	Portugal	N.I.	VL	L-AmB and PENT	23	27-48	M: 21 F: 2	No	Yes (26,1%)	VL/HIV	Retrospective cohort study/immunological investigation	Immunologicals and therapeutic regimens
Simão, Vitória and Fortaleza (2020)	Brazil	N.I.	VL	AmB, L-AmB and Antimonials	571	0-60+	M: 362 F: 209	No	Yes (6,8%)	VL/HIV	Retrospective cohort study/immunological investigation	Clinical and immunological

Ostyn <i>et al.</i> (2014)	India and Nepal	N.I.	VL	MIL	853	02-25+	M: 525 F: 328	No	Yes (6,2%)	No	Prospective cohort study	Clinical and immunological
Elmekki <i>et al.</i> (2016)	Sudan	N.I.	VL	SS	25	N.I.	N.I.	Yes (20%)	No	No	cross section / immunological investigation	Immunological
Rijal <i>et al.</i> (2013)	Nepal	N.I.	VL	MIL	120	N.I.	M: 74 F: 46	No	Yes (20,0%)	No	Prospective cohort study	Clinical
Mohammed <i>et al.</i> (2020)	Ethiopia	N.I.	VL	L-AmB, SS, L-AmB + MIL, SS+PAR, PENT	12	05-41	M: 12 F: 0	No	Yes (100%)	VL/HIV	Case series	Immunological
Goyal <i>et al.</i> (2020)	India	N.I.	PKDL and VL	L-AmB, MIL +PAR and L-AmB + MIL	1761	02-80	M: 1.067 F: 694	No	Yes (4,5%)	N.I.	Clinical trial	Clinical, immunological and therapeutic regimens
Troya <i>et al.</i> (2008)	Spain	N.I.	VL	GLU, AmB, L-AmB and MIL	4	32-45	M: 3 F: 1	No	Yes (75%)	VL/HIV	Retrospective cohort study	Therapeutic regimens
Pasquau <i>et al.</i> (2005)	Spain	N.I.	VL	GLU, AmB, PENT, L-AmB	155	30-37	M: 129 F: 26	No	Yes (24%)	VL/HIV	Retrospective cohort study / immunological investigation	Clinical, immunological and therapeutic regimens
Casado <i>et al.</i> (2001)	Spain	N.I.	VL	GLU and AmB	10	31-38	M: 6 F: 4	No	Yes (70%)	VL/HIV	Prospective cohort study / immunological investigation	Immunological
Bourreau <i>et al.</i> (2015)	French Guiana	<i>L. guyanensis</i>	CL	PENT and GLU	75	Not specified	M: 66 F: 9	Yes (5%)	Yes (17,33%)	No	Prospective cohort study / immunological investigation	Presence of LRV virus

Gitari <i>et al.</i> (2018)	Kenya	<i>L. tropica</i>	CL	SS	52	05-52	M: 21 F: 31	Yes	Yes (44,2%)	N.I.	Epidemiological	Therapeutic regimens
Christen <i>et al.</i> (2018)	French Guiana and mainland France	<i>L. guyanensis</i>	CL	PENT	73	21-44	M: 72 F: 1	Yes (32,8%)	No	N.I.	Case series	Route of drug administration

Drugs and therapies separated by “and” indicate different monotherapy regimens, while drugs joined by “+” indicate combination therapy. M: Male; F: Female; CL: Cutaneous Leishmaniasis; VL: Visceral Leishmaniasis; MCL: Mucocutaneous Leishmaniasis; PKDL: Post-Kala-azar Dermal Leishmaniasis; GLU: Meglumine Antimoniate (Glucantime®); SS: Sodium Stibogluconate (Pentostan®); PENT: Pentamidine; PAR: Paromomycin; AmB: Amphotericin B; L-AmB: Liposomal Amphotericin B; MIL: Miltefosine; N.I.: Not Informed.

CAPÍTULO II

Artigo a ser submetido na Revista American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

Qualis - Interdisciplinar: A2

Fator de Impacto: 2.45

Sensibilidade de *Leishmania (L.) infantum* ao Antimônio e Anfotericina B pode ser um fator correlacionado com aspectos clínicos e laboratoriais de pacientes com Leishmaniose Visceral?

Gustavo de Almeida Santos^{1,2} e Mayara Ingrid Sousa Lima*^{1,2,3}.

1 Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil.

2 Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil.

3 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil.

* Autor Correspondente: Mayara Ingrid Sousa Lima

Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, CEP 65080-805, Maranhão, Brasil. E-mail: mayara.ingrid@ufma.br (M.I.S. Lima)

Resumo:

No Brasil, o tratamento de Leishmaniose Visceral conta com apenas duas linhas principais de terapia, o antimonial Glucantime[®] e o antifúngico poliênico Anfotericina B, não sendo incomuns os casos de Falhas de Tratamento e Recidivas Clínicas. Nesse sentido, objetivou-se correlacionar dados clínicos e laboratoriais de pacientes com Leishmaniose Visceral e a sensibilidade *in vitro* dos isolados clínicos do *Leishmania (Leishmania) infantum*. Trata-se de uma pesquisa experimental, cuja atividade dos fármacos em isolados clínicos de *L. (L.) infantum* foi avaliada utilizando ensaio de viabilidade celular, sendo os valores de IC50 determinados e correlacionados com os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes obtidos pela análise de prontuários e acompanhamento médico. Os resultados preliminares mostram que dos 13 participantes da pesquisa, a Falha de Tratamento ocorreu em 38,5% dos pacientes e a Recidiva Clínica em 23,1% desses. Dos 13 isolados clínicos coletados, 3 foram resistentes na forma promastigota ao Antimônio Trivalente com variação de sensibilidade entre 31.7±17.5 e 155.2 ± 3.6 µM, assim como 1 isolado promastigota foi resistente a Anfotericina B e nesse fármaco, os isolados clínicos tiveram uma variação de sensibilidade entre 48.1 ± 9.9 e 622.4 ± 16.8 nM. Foi encontrada uma correlação entre a sensibilidade ao Antimônio Trivalente e a Anfotericina B (R = 0,598; P = 0,031), entretanto, não houve uma correlação entre a sensibilidade do parasito e os casos de Falha de Tratamento, Recidiva Clínica ou qualquer outra variável clinica e laboratorial dos pacientes com LV. Em conclusão, a sensibilidade do *Leishmania (L.) infantum* ao Antimônio Trivalente e Anfotericina B não foi causa direta para ocorrência da Falhas de Tratamento ou Recidivas Clínicas, bem como não apresentam uma correlação positiva com outras variáveis clínicas de agravamento dos pacientes com Leishmaniose Visceral.

Palavras-chave: Calazar. Falha de Tratamento. Recidiva

1. Introdução

A Leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos aos humanos pela picada das fêmeas do inseto flebotômico infectado pelo parasita. Dentre as três principais formas clínicas da doença, a Leishmaniose Visceral (LV) representa a forma clínica mais grave, e possui uma incidência anual estimada em cerca de 30.000 novos casos em todo o mundo. Pode chegar a uma mortalidade de até 100% em dois anos quando a doença não é tratada. Esta doença apresenta como principais sinais e sintomas, a febre irregular, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia grave, perda substancial de peso, palidez, astenia, manifestações hemorrágicas e edemas. Além disso, é possível observar alterações em seus exames laboratoriais, como: leucopenia, plaquetopenia, neutropenia, entre outros (PASTORINO, *et al.*, 2002; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020).

A quimioterapia é a principal ferramenta utilizada para o controle e tratamento da Leishmaniose. No Brasil, os fármacos mais utilizados são o Antimoniato de Meglumina e a Anfotericina B na sua formulação Desoxicolato e Lipossomal. Apesar da comprovada eficácia desses fármacos no combate a essas doenças, algumas questões ainda precisam ser consideradas, como a toxicidade, cinética e via de administração que pode provocar grandes limitações a seu desempenho (ULIANA, TRINCONI & COELHO 2018). A compreensão destes mecanismos pode auxiliar na escolha da melhor opção terapêutica para potencializar o desfecho clínico benéfico para paciente.

O sucesso do tratamento e o desfecho clínico de cura acabam sendo interpelados por fatores complexos, visto que envolvem aspectos relacionados ao hospedeiro, como imunidade e perfil genético, assim como coinfeção com vírus e bactérias; aspectos relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos e a presença de cepas resistentes do parasita aos fármacos (PONTE-SUCRE, 2017). Nesse sentido, a sensibilidade fenotípica da *L. (L.) infantum* possui grande importância no planejamento terapêutico, podendo revelar dados sobre a resistência do parasito a fármacos. Da mesma forma, a virulência do parasita é relevante para a análise de fatores parasitários, considerando que podem afetar o desenvolvimento da doença, dada a biodiversidade do parasita e sua capacidade de adaptação (GARIN *et al.*, 2001).

Evidências também têm mostrado a ocorrência de alterações na sensibilidade do parasito em outras espécies, como no caso do *Leishmania braziliensis*, no qual a resistência ao antimônio em isolados clínicos pode estar associada à redução da absorção do fármaco (RUGANI *et al.*, 2019) ou do *Leishmania guyanensis*, no qual a redução da suscetibilidade pode estar relacionado ao mecanismo molecular da mutação de resistência (G133D) à droga que altera a conformação do poro e causa uma mudança na difusão da droga no organismo (TUNES *et al.*,

2021). Achados de um estudo colombiano têm sugerido que *Leishmania amazonensis* na presença do Antimônio Trivalente (Sb^{III}), superregula os genes que codificam proteínas de autofagia como uma estratégia de sobrevivência para escapar da ação do fármaco (PATINO, MUSKUS & RAMÍREZ, 2019).

A literatura registra a utilização dos antimoniais e de Anfotericina B em vários países no tratamento de Leishmaniose, entretanto, também tem sido registrado um aumento nos casos refratários, especialmente ao tratamento com antimoniais em países como a Índia e Sudão (SUNDAR *et al.*, 2000; PALACIOS *et al.*, 2001; BERMUDEZ *et al.*, 2006; GOTO e LINDOSO, 2010). No Brasil, também já foram registrados casos de resistência no Rio de Janeiro, Bahia e Amazonas (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1997; ROMERO *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2008). Uma majoritária porcentagem de patógenos que entram em contato com fármacos morrem, entretanto, alguns parasitas são selecionados diante da pressão exercida pelos fármacos, e conseguem sobreviver e expressar mutações que favorecem sua sobrevivência (PADRÓN- NIEVES & PONTE-SUCRE, 2020). Outro ponto a ser investigado é se a presença de parasitos tolerantes pode relacionar-se ao agravamento nas manifestações de sinais e sintomas clínicos nos pacientes com LV, dessa maneira, a sensibilidade de *L. (L.) infantum* poderia prever a ocorrência de manifestações clínicas de maior gravidade.

Para o nosso melhor conhecimento, esse estudo é pioneiro em uma área de alta endemia com o objetivo de avaliar a sensibilidade *in vitro* frente a Antimônio e Anfotericina B em formas promastigotas de *L. (L.) infantum* obtidas de pacientes com Leishmaniose Visceral para correlacionar com suas manifestações clínicas e laboratoriais. Este estudo investigou a hipótese da possível relação entre o aumento da tolerância do parasito aos fármacos utilizados na LV e os desfechos clínicos observados nos pacientes, especialmente aqueles relacionados a Falhas de Tratamento e/ou Recidiva Clínica.

2. Metodologia

2.1 Desenho do estudo e amostras biológicas

Um estudo experimental foi conduzido com amostras biológicas de aspirado de medula óssea de paciente em tratamento para LV em um hospital público de referência para tratamento de doenças infecto-parasitárias, na cidade de São Luís, Maranhão, Brasil. As amostras avaliadas foram armazenadas no biorrepositório do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFMA (parecer nº: 3.921.086). Todos os pacientes participantes foram informados sobre os procedimentos envolvidos na coleta, armazenamento das amostras

e objetivos da pesquisa, e após o completo entendimento dos mesmos, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Vale ressaltar que o aspirado de medula óssea faz parte do protocolo padrão do atendimento médico para confirmação do diagnóstico de LV e acompanhamento dos pacientes, especialmente aqueles com recidivas. Nesse sentido, nenhum indivíduo foi submetido a esse procedimento sem que tenha ocorrido uma solicitação médica prévia.

Os isolados clínicos de *L. (L.) infantum* foram obtidos de pacientes advindos de diversas regiões do Maranhão, com suspeita ou confirmação do quadro clínico de Leishmaniose Visceral, independentemente do sexo, faixa etária, condições socioeconômicas, coinfeções com outros patógenos, ocorrência ou não de tratamento prévio para a doença, Falha de Tratamento, assim como Recidivas Clínicas. Portanto, esse estudo apresenta uma amostra de conveniência.

2.2 Classificação dos pacientes

A coleta da medula óssea é realizada quando o paciente apresentar um ou mais dos sinais clínicos descritos a seguir: a) febre persistente durante 7 dias sem outro diagnóstico clínico evidente; b) febre de qualquer duração associado à esplenomegalia ou hepatoesplenomegalia; c) presença de uma ou mais citopenia (anemia, leucopenia e/ou plaquetopenia) em um hemograma previamente solicitado. Os pacientes com confirmação clínica para a doença são aqueles que apresentarem nos testes: I) presença de formas amastigotas do parasita no exame parasitológico direto em medula óssea; II) reação positiva no teste imunocromatográfico (teste rápido IT-LEISH®); III) titulação 1:80 no teste de reação de imunofluorescência reativa (RIFI); ainda, são inclusos pacientes que apresentarem recidiva clínica entendidos como quando sinais e sintomas clínicos ressurgem em até 12 meses desde a cura clínica, e/ou Falha de Tratamento, conceituada quando não é possível alcançar a cura clínica mesmo após a segunda dose regular da terapia farmacológica (BRASIL, 2014).

É importante considerar que nesse trabalho os pacientes que tiveram aspirados de medula óssea coletados foram organizados em três subtipos:

01. Casos novos, onde o aspirado de medula óssea foi coletado pelos profissionais do hospital com o objetivo de diagnosticar a LV, assim como iniciar o tratamento do paciente. Dessa forma, esses pacientes tiveram confirmação de LV e os isolados clínicos obtidos dos mesmos nunca foram submetidos a tratamentos prévios;

02. Casos de Recidiva Clínica, onde o paciente já teve o desenvolvimento inicial de LV, foi tratado e recebeu alta hospitalar por cura clínica, mas no período de até 12 meses houve

o recrudescimento de sinais e sintomas clínicos da doença, sendo necessária a realização de um novo aspirado de medula óssea para confirmação da presença do parasito. Nesses casos os parasitos obtidos já foram previamente expostos a fármacos.

03. Casos de Falha de Tratamento, onde o paciente já foi diagnosticado e tratado para LV, contudo a terapia empregada não foi eficaz na eliminação do parasito e ainda é possível observar as formas amastigotas na medula óssea do paciente, bem como a permanência de sinais clínicos. Para esses casos, os isolados clínicos obtidos são de pacientes que também já foram tratados previamente, considerando que a coleta do aspirado de medula óssea é solicitado pela equipe médica para confirmar a permanência do parasito diante do insucesso do tratamento.

2.3 Isolamento do parasito a partir do aspirado de medula óssea

A coleta do aspirado de medula óssea segue todas as recomendações do Manual do Ministério da Saúde (2006). O material coletado é macerado (quando necessário) e realizada a diluição seriada em uma placa de 24 poços contendo meio de cultura Schneider (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativo (Gibco®). Após 10 dias, as formas amastigotas intracelulares se transformarão em promastigotas e 1×10^6 parasitas/mL são transferidas para um frasco de cultura de 25 cm³ com o mesmo meio de cultura Schneider suplementado com 20% de Soro Fetal bovino inativo (Gibco®), 10 U/mL de penicilina (Gibco®) e 10 µg/mL de estreptomicina (Gibco®). A cultura é mantida em estufa B.O.D a 26°C e observada diariamente até atingir a fase exponencial de crescimento para então serem aliqüotadas e congelados em freezer -80°C para posterior utilização. Foi utilizada como referência a cepa padrão MHOM/BR/74/PP75 e os isolados clínicos coletados foram codificados utilizando o seguinte sistema de identificação MHOM/BR/2019/XXXX-MA (XXX representando o código que a amostra de cada paciente recebe ao ser processada em laboratório).

2.4 Informações clínico-epidemiológicas dos pacientes

Através do prontuário dos pacientes foram coletadas informações sobre as variáveis clínicas: idade, gênero, localização geográfica, coinfeção bacteriana ou com HIV, tratamento, desfecho clínico (cura ou morte), Falhas de Tratamento ou Recidivas Clínicas, histórico de tratamento, febre, esplenomegalia, hepatomegalia, desnutrição grave, diarreia, palidez, arritmia, presença de sítios hemorrágicos, edema, icterícia, vômitos, dispnéia e outros sinais/informações clínicas, além da contagem de leucócitos, plaquetas, creatina, hemácias,

hematócritos, hemoglobinas, gama GT, neutrófilos, AST/TGO, ALT/TGP, bilirrubina total, bilirrubina direta, albumina e ureia.

Os dados também são correlacionados com o modelo que prediz as chances de morte do paciente baseado em dados clínicos e laboratoriais, denominado Kala-cal (<https://www.sbmt.org.br/kalacal/>).

2.5 Ensaios laboratoriais

2.5.1 Fármacos

Os fármacos utilizados na pesquisa foram: Antimônio Trivalente – tartarato de antimônio e potássio tri-hidratado - Sb^{III} (Sigma®, St. Louis, MO, EUA) para as formas promastigotas, gentilmente cedida pelo hospital, além de Anfotericina B (Sigma®).

2.5.2 Identificação do parasito

A extração de DNA do parasito foi realizada pelo método Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989). Logo após, foi realizada a determinação da concentração e qualidade do DNA através de um Espectrofotômetro NanoDrop® 2000 Thermo Scientific. Após isso, foi realizada a amplificação do DNA através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase – PCR utilizando os iniciadores LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5-8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') que são específicos para tripanosomatídeos, tem como alvo o rRNA Internal Transcriber Spacer 1 (ITS1) e amplifica um fragmento de aproximadamente 300-350 pares de bases (SCHÖNIAN *et al.*, 2003). Os produtos de PCR amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (UltraPure™ Agarose, Invitrogen™).

Em seguida, foi realizado o Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP) com os produtos amplificados de PCR-ITS1, os quais sofreram digestão enzimática através da enzima de restrição HaeIII (Promega™, MA, EUA) durante 2 horas em banho maria a 37°C. Após esse processo os produtos de PCR-RFLP foram submetidos a Eletroforese em gel de agarose a 4% (UltraPure™ Agarose, Invitrogen™), onde os fragmentos obtidos foram analisados e comparados com controles positivos de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) e *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903).

2.5.3 Atividade de droga contra formas promastigotas de *L. (L.) infantum*

A atividade do fármaco contra formas promastigotas de *L. (L.) infantum* é avaliada utilizando o teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina). O

protocolo utilizado foi previamente descrito por Zauli-Nascimento *et al.* (2010). Os parasitos são plaqueados a uma densidade de 2×10^6 promastigotas/poço e incubados em uma série crescente do fármaco – 48h para o Antimônio Trivalente e 24h para Anfotericina B – a 26°C. Após esse período é adicionado 30 µL de MTT (5 mg/mL) (Sigma, St. Louis, 145 MO, EUA), e após 3 horas, a reação é interrompida utilizando 50 µL de SDS (docedil sulfato 146 de sódio) 20%. A leitura da densidade óptica (D.O) é feita por espectrometria no leitor de microplacas, medindo-se a absorbância em 595 nm, utilizando como referência o comprimento 690 nm. Os ensaios são realizados em triplicada e repetidos independentemente duas vezes. Os valores de EC50 (Concentração Efetiva da droga que inibe a viabilidade celular em 50%) são determinados por curvas de regressão sigmoide utilizando o programa GraphPad Prism® 7.0.

2.5.4 Critérios para definição de isolado susceptível ou resistente

Não foram encontrados na literatura parâmetros de classificação para definir qual o cut off deve-se considerar o parasito resistente aos fármacos, ou seja, quantas vezes maior deve ser a EC50 do isolado clínico em relação a cepa de referência. Para facilitar análise utilizou-se índice de resistência (AI), que representa a razão do valor da EC50 do isolado clínico pelo valor da EC50 da cepa de referência. Dessa forma, para fins desse trabalho, os isolados clínicos foram divididos em duas categorias: Susceptíveis, que englobam todos os isolados que com $AI < 1x$ ou ainda aqueles com $AI < 2x$; Resistentes, que incluem aqueles isolados clínicos com $AI > 2x$.

2.6 Análise estatística

O percentual de infecção, o índice de infecção e o EC50 (Concentração Efetiva do fármaco que inibe 50% da população de *Leishmania*) foram determinados utilizando o programa GraphPad Prism® v.5.0.

A análise dos dados foi realizada utilizando os softwares SPSS® versão 28.0 (IBM, Chicago, IL, USA) e GraphPad Prism® versão 9.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A estatística descritiva foi processada utilizando medidas de frequência absoluta, frequência relativa (%), média, mediana e desvio-padrão ($\pm dp$).

Para análise dos dados laboratoriais coletados, foi utilizado como parâmetros para avaliação dos resultados o livro Wallach: interpretação de exames laboratoriais dos autores Williamson e Snyder (2016) e a Calculadora de Severidade do Calazar (KALA-CAL), disponível em: <http://sbmt.org.br/kalacal/>, seguindo os valores de referência apresentados.

Foi utilizada uma abordagem exploratória para testar a relação entre as variáveis clínicas e laboratoriais com o valor do teste de sensibilidade Sb^{III} e AmB. O teste Mann-Whitney foi

utilizado para comparar o escore Kala-cal clínico entre os pacientes com isolados clínicos susceptíveis e resistentes ao Sb^{III}. A análise correlação de Pearson foi utilizado para estimar a correlação linear entre os valores AI de Sb^{III} a AmB com os fatores idade, escore Kala-cal clínico e marcadores séricos. Além disso, o coeficiente de regressão ajustado para idade foi estimado para avaliar o efeito sobre o AI Sb^{III} e AmB. O nível de significância adotado foi de 5%.

3. Resultados

3.1 Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes com Leishmaniose Visceral de origem dos isolados clínicos

Dados de um total de 13 pacientes diagnosticados com LV foram incluídos no presente estudo. Observou-se que na amostra avaliada, o sexo masculino foi predominante (84%), a maioria (69,2%) era residente em municípios no interior do estado do Maranhão, com uma média de idade de $32,2 \pm 10,4$ anos. Além disso, 53,8% dos pacientes tinham sorologia negativa para HIV, mas vale ressaltar que foi utilizada uma amostra de conveniência, dessa forma, preferencialmente eram coletadas amostras de pacientes sem a referida coinfeção (Tabela 1). Quanto ao tratamento realizado nos pacientes deste estudo, 61,5% ainda não tinha iniciado o tratamento para a doença, e dentre esses 53,8% conduziram o tratamento subsequente com Anfotericina B Lipossomal - LAmB e 23% com Antimoniato de Meglumina - AM. Dos 13 pacientes acompanhados, a Falha de Tratamento - FT ocorreu em 38,5% dos casos e a Recidiva Clínica - RC em 23,1%, com uma taxa de cura de apenas 69,2% dos casos após o final do tratamento completo da doença. (Tabela 1). Vale ressaltar que pela característica do estudo, foram priorizados a coleta de amostra de pacientes com FT e RC, o que justifica o alto percentual desses episódios nessa amostra e que foi adotado o conceito de Falha de Tratamento e Recidiva Clínica apresentado pelo Ministério da Saúde do Brasil.

Quanto aos sinais e sintomas clínicos, a anemia ocorreu em todos os pacientes, hepatoesplenomegalia foi encontrado em 92,3% das pessoas, febre e palidez foram relatados por 84,6% dos doentes e diarreia com 38,4% de casos. Ainda foram registrados sintomas como: vômito e dispneia (15,3%), infecção bacteriana e/ou edema (7,6%) (Tabela 2).

Quanto aos achados laboratoriais, todos os pacientes apresentavam nível de hemoglobinas <14 g/dl, o que corrobora com a informação em que todos os pacientes apresentaram anemia e a maioria deles também estavam com palidez. A leucopenia esteve presente em 84,6% dos casos com pacientes apresentando uma taxa de leucócitos <4.000 mm³, dentre esses, 36,3% eram casos de leucopenia grave <1.500 mm³. Já a plaquetopenia e a

neutropenia também foram encontradas em 61,5% dos pacientes. Os exames apontaram ainda que 76,9% dos participantes apresentaram hipoalbuminemia com o nível de albumina <3.5 g/dl, já aproximadamente 61,5% dos pacientes tiveram a taxa de creatinina em alta, com índices maiores que >0.7 mg/dl e cerca de 53,8% apresentaram alterações nos níveis de ureia com mais de 23 mg/dl. Os exames de albumina, ureia e creatinina chamam a atenção para um possível comprometimento dos rins no desenvolvimento da LV, algo que até o momento não está claro o motivo, visto que isso poderia ser causada pela infecção do parasito e/ou pela ação dos fármacos utilizados no tratamento da LV. Também foi encontrado através dos exames o comprometimento hepático mostrado com os níveis de Bilirrubina Total maiores que 1,2 mg/dl em 38,4% dos casos e de Bilirrubina Direta com 53,8% dos casos mostrando valores >0.4 mg/dl (Tabela 3).

3.2 Sensibilidade *in vitro* dos isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum*

3.2.1 Identificação e Caracterização dos Isolados Clínicos

Ao realizar a coleta da medula óssea e isolamento do parasito de *Leishmania* spp. em laboratório, os mesmos foram cultivados e foi realizada a identificação e caracterização do parasito através da técnica de PCR/RFLP, em que foi possível identificar e comprovar que todos os parasitos encontrados são da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*, como é possível ver através da eletroforese em gel de agarose 4% (Figura 1).

3.2.2 Sensibilidade dos isolados clínicos (promastigotas)

Foi possível encontrar 3/13 isolados clínicos resistentes na forma promastigota ao antimônio trivalente (23%), sendo eles MHOM/BR/2018/PV008-MA que teve um EC50 de 133.8 ± 14.1 , MHOM/BR/2019/PV020-MA, cujo EC50 foi de 155.2 ± 3.6 e MHOM/BR/2019/PV021-MA que teve como EC50 142.4 ± 6.0 . Já para Anfotericina B, apesar da grande maioria dos isolados apresentarem alteração na sensibilidade, apenas 1/13 isolado clínico atendeu ao critério adotado e teve EC50 maior que duas vezes o valor da cepa de referência (7,7%) que foi o MHOM/BR/2018/PV008-MA que apresentou um EC50 de 3,5 vezes superior à cepa padrão, com 622.4 ± 16.8 .

3.3 Correlação dos dados clínicos e sensibilidade *in vitro* dos isolados clínicos

3.1 Promastigotas

A análise de correlação foi realizada utilizando os valores de sensibilidade *in vitro* de formas promastigotas frente ao Antimônio Trivalente ou Anfotericina B e o modelo de

severidade Kala-cal clínico (Tabela 5). Uma correlação moderada direta foi detectada entre AI-Sb^{III} e AI-AmB (R = 0,598; P = 0,031). Entretanto, Kala-cal clínico não apresentou correlação estatisticamente significativa com os valores da sensibilidade para nenhum dos dois fármacos avaliados. A Figura 2 expressa o mapa de calor desta análise de correlação, reforçando os resultados apresentados na Tabela 2, onde somente a correlação entre a sensibilidade para Sb^{III} e AmB tem correlação moderada (0,598).

A Figura 3 apresenta a análise comparativa do Kala-cal clínico entre as categorias susceptível e resistente ao Sb^{III}. Nessa análise não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes dentre as categorias (P = 0,269). Entretanto, é possível observar que os pacientes susceptíveis tiveram uma distribuição mais próxima do esperado, visto que a maioria estava abaixo da linha mediana correspondendo a valores do índice de Kala-cal mais baixos, quando os resistentes estavam muito mais dispersos no gráfico, contudo, esses resultados poderiam ter representado diferença estatística caso houvesse um N amostral maior de isolados clínicos resistentes.

A FT e RC não ocorreram em nenhum dos isolados clínicos considerados resistentes. A análise comparativa dos valores de AI do teste de sensibilidade ao Sb^{III} e AmB não mostrou diferenças estatisticamente significantes para os desfechos clínicos Falha de Tratamento e Recidiva Clínica (Tabela 7).

Uma correlação moderada direta significativa foi observada entre idade e AI Sb^{III} (R = 0,555; P = 0,0490), ou seja, na amostra isolados mais sensíveis foram encontrados em pacientes de menor idade e isolados menos sensíveis foram encontrados em indivíduos de maior idade. Uma tendência de correlação direta foi observada entre idade de AI AmB (R = 0,543; P = 0,055) (Figura 4).

A análise de correlação linear entre os valores de AI ao Sb^{III}, de AI ao AmB e das medidas séricas (hemoglobina, plaquetas, leucócitos, neutrófilos, AST/TGO, AST/TGP, bilirrubina total, bilirrubina direta, albumina, ureia, creatinina) demonstrou que não foram identificadas medidas de correlação estatisticamente significantes. Entretanto, vale destacar que houve uma tendência de correlação direta entre nível de leucócitos e AI Sb^{III} (R = 0,569; P = 0,053), e entre nível de creatinina e AI AmB (R = 0,555; P = 0,076). Em outras palavras, o nível de sensibilidade dos isolados clínicos não possuem uma relação com os resultados laboratoriais dos pacientes, concordando com os resultados anteriores onde os isolados clínicos resistentes não ocasionaram uma maior severidade nos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes (Tabela 6) e (Figura 5).

Os resultados da análise de regressão das variáveis clínicas (tratamento prévio, Falha de Tratamento, recidiva, febre, esplenomegalia, hepatomegalia, diarreia, icterícia, palidez, edema, vômito, dispneia, infecção bacteriana) sobre a AI de Sb^{III} (Tabela 8) e AI de AmB (Tabela 9) ajustada para idade também não mostrou diferença estatística. Os valores de P tiveram variação entre 0,092 e 0,933 como pode ser observado na Tabela 8, já na Tabela 9 essa variação do valor de P vai de 0,260 e 0,938.

A Tabela 10 expressa a análise de relação entre os fatores demográficos, clínicos e laboratoriais com os desfechos falha terapêutica e recidiva do LV. Notou-se, na amostra, que os pacientes mais jovens tiveram de maior frequência de Falha de Tratamento ($\beta = -0,03$; SE = 0,01; P = 0,020) e recidiva ($\beta = -0,02$; SE = 0,01; P = 0,009). A ocorrência de tratamento prévio foi relacionada maior ocorrência tanto de falha terapêutica ($\beta = 0,67$; SE = 0,22; P = 0,011) e quanto de recidiva ($\beta = 0,60$; SE = 0,18; P = 0,009). Além disso, observou-se que pacientes que apresentava febre no momento da internação tiveram menos recidiva ($\beta = -0,90$; SE = 0,22; P = 0,002), e maiores nível de albumina foram observados em pacientes com apresentaram recidiva (EP = 0,712; P = 0,014).

4. Discussão

A Leishmaniose Visceral é uma das principais doenças tropicais negligenciadas e ocorre principalmente em países nos quais as forças de mercado são insuficientes para gerar interesse na indústria farmacêutica, ou seja, países com baixo retorno financeiro para grandes produtoras, o que pode limitar a atividade licenciada para pesquisa, desenvolvimento, comercialização e distribuição de drogas farmacêuticas que possam melhorar o tratamento e o controle da LV (PINK *et al.*, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Dessa maneira, a realização de estudos que envolvam o *Leishmania* é fundamental para que seja possível o combate da Leishmaniose Visceral.

Assim, nossos resultados destacam a importância do entendimento da sensibilidade do parasito frente a desfechos clínicos que complicam ainda mais o tratamento e controle da Leishmaniose Visceral, através de estudos laboratoriais e experimentais, para inspirar e gerar comprometimento, atitudes e ações a fim de diminuir os danos causados pela LV na população que já sofre com muitas mazelas. Até onde temos conhecimento, nossos resultados são inéditos, considerando o tamanho e características amostral, além das correlações realizadas, que buscam compreender se o fenótipo de suscetibilidade ou resistência pode contribuir para quadros clínicos mais severos e desfechos clínicos de FT e RC. Neste estudo, utilizamos uma abordagem epidemiológica e experimental para avaliar a sensibilidade de isolados clínicos de *Leishmania*

(*L. infantum*) e correlacionar com os dados clínicos e epidemiológicos dos 13 indivíduos com LV de origem dos parasitos, sendo esses pacientes provenientes do estado do Maranhão, Brasil, área de alta endemia para forma visceral da leishmaniose (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2021). Nessa abordagem testamos dois fármacos, Antimoniato de Meglumina e Anfotericina B, os dois principais utilizados na linha de frente para o tratamento da doença no Brasil (BRASIL, 2014).

Nos parágrafos seguintes, discutimos a relação da sensibilidade do parasito aos fármacos com o desenvolvimento de sinais e sintomas clínicos mais graves. Em seguida, nos concentramos em qual a importância da sensibilidade dos isolados clínicos nas ocorrências de Falha de Tratamento e Recidiva Clínica. Terminamos discutindo quatro implicações de nossos resultados para o tratamento e controle da Leishmaniose Visceral no Maranhão.

4.1 A sensibilidade do parasito aos fármacos tem importância no quadro clínico do paciente com Leishmaniose Visceral?

A baixa suscetibilidade do parasito a fármacos pode contribuir para um comprometimento do tratamento (DIOTALLEVI *et al.*, 2021), o aumento da virulência do parasito, ou seja, da sua capacidade de causar danos no hospedeiro (OUAKAD *et al.*, 2011), torná-los mais aptos, com melhores chances de sobreviver dentro do hospedeiro (VANAERSCHOT *et al.*, 2012) e com maior poder de infecção (VANAERSCHOT *et al.*, 2010). Considerando as poucas alternativas de fármacos disponíveis comercialmente contra o *Leishmania* spp., além largo espectro de estudos laboratoriais acessíveis na literatura em que as diversas espécies de *Leishmania* conseguem adquirir resistência a fármacos, monitorar a sensibilidade desses isolados clínicos em circulação na população e a eficácia dos fármacos antileishmaniais utilizados, é imprescindível para o controle da doença e da disseminação de parasitos resistentes na população. Podendo ainda ser a sensibilidade associada a outros fatores como a ocorrência de sinais e sintomas clínicos mais graves.

Ao contrário do que acontece no gênero *Leishmania*, a resistência medicamentosa em outras espécies de parasito pode ser acompanhada de custos maléficos ao microrganismo, como acontece com *Plasmodium* onde cepas resistentes são menos “aptas” que isolados selvagens (BABIKER, HASTINGS & SWEDBERG, 2009). Essa característica também foi observada em outros Domínios, como no caso de bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, em que as cepas resistentes apresentaram redução no crescimento, aptidão e virulência (ABDELRAOUF *et al.*, 2011). A resistência de cepas de *Leishmania* induzida em laboratório, principalmente ao antimonial, é parcialmente compreendida na literatura, contudo, a resistência medicamentosa

em isolados clínicos de campo ainda vem sendo estudada. Dessa maneira, compreender como isolados clínicos se comportam quando expostos a medicamentos utilizados na rotina de tratamento da Leishmaniose Visceral e os casos de resistência na prática, é fundamental para o entendimento da doença em seu contexto clínico original (VERGNES *et al.*, 2007).

Os nossos resultados são complexos e geram repercussões positivas e negativas. No primeiro caso porque essa é uma variável de peso e aqui foi provado que a sensibilidade do parasito ao Antimônio Trivalente e à Anfotericina B de maneira isolada não influenciou nos sinais e sintomas clínicos apresentados pelos pacientes e isso contribui para um melhor controle do parasito, contudo, outros fatores que podem estar associados à diminuição na sensibilidade e que aqui não foram avaliados, como a virulência, capacidade de infecção e/ou aspectos genéticos do parasito, talvez possam ter ação sobre a ocorrência de sinais e sintomas clínicos mais graves. Não conseguimos encontrar na literatura estudos que correlacionam sinais e sintomas apresentados pelos pacientes com a participação do parasito.

Os principais sinais e sintomas encontrados nessa amostra (anemia, hepatoesplenomegalia, febre e palidez), correspondem com a sintomatologia de LV apresentada por Brasil (2014), sendo o sintoma mais expressivo a anemia que ocorreu com todos os pacientes, os quais tiveram uma taxa de hemoglobina média de 8,3 g/dl, o que é preocupante, dado que o valor mínimo para os parâmetros de hemoglobina é de 14 g/dl. Uma hipótese para esse resultado é a possibilidade de um quadro de anemia pré-instalado antes da infecção pelo parasito, o que poderia justificar a ocorrência da LV em pacientes adultos e sem doenças imunes, considerando que a anemia pode comprometer a competência imunológica como já citado por Vieira e Ferreira (2010) e André *et al.* (2018). Podendo ainda ser originada de diversos fatores combinados como a carência nutricional e infecções concomitantes por parasitas intestinais (SILVA *et al.*, 2021). Considera-se também a ocorrência de agravamento do quadro de anemia causado pela infecção e multiplicação do próprio *parasito* no organismo humano.

É importante ressaltar que, estudos com modelos experimentais há bastante tempo já abordavam sobre a relação da LV com anemia grave e lise prematura de eritrócitos, considerando ainda que nessa amostra alterações na membrana poderiam levar a redução do tempo de vida das hemácias (BISWAS *et al.*, 1995). Resultados recentes mostram que *L. donovani* pode induzir ativamente macrófagos a fagocitarem hemácias saudáveis (MORIMOTO *et al.*, 2019). Em outro protozoário, estudos têm mostrado uma relação entre o polimorfismo genético humano e a infecção pelo parasito, como descrevem os autores Pathirana *et al.* (2013), que indivíduos do grupo sanguíneo O são mais resistente a malária causada pelo

Plasmodium falciparum que os demais tipos sanguíneos, podendo assim influenciar no desfecho da doença. Entretanto, os autores Resende *et al.* (2017) encontraram que indivíduos do tipo sanguíneo O infectados com *Plasmodium vivax* apresentaram níveis mais baixos de hemoglobinas e hemácias, sendo a anemia mais frequente nesse grupo. Não encontramos trabalhos que relacionem a infecção pelo *Leishmania* e/ou a anemia com o tipo sanguíneo, entretanto, apesar desses parasitas serem bastante diferentes, vale se considerar a realização de estudos que relacionem o tipo sanguíneo com a infecção do parasito, anemia, desfechos clínicos e outras características da Leishmaniose, pois essas informações podem ser cruciais para o tratamento da doença.

4.2 A sensibilidade do parasito aos fármacos tem importância na ocorrência da Falha de Tratamento e na Recidiva Clínica?

Observamos em nossos isolados clínicos uma grande variação na sensibilidade ao Antimônio Trivalente (31.7 a 155.2 μM) e à Anfotericina B (48.1 a 622.4 nM), demonstrando a heterogeneidade na população de *Leishmania* que circula no estado do Maranhão. Na literatura, há muito tempo a espécie de *L. (L.) infantum* já é mencionada como heterogênea com diferentes perfis de infecção, tal qual relatado por Honoré *et al.* (1998). Assim como também encontrado pelos autores Luz *et al.* (2011), que observaram uma significativa variação (5.1 a 17.1 $\mu\text{g/mL}$) em isolados clínicos de *L. (L.) infantum* coletados de 5 estados brasileiros sujeitos à ação do Sb^{III} , o que foi confirmado por Espada *et al.* (2021) em seu estudo, que encontraram uma considerável variação (20.0 a 69.0 nM) em isolados clínicos da referida espécie coletados em 14 estados do Brasil e expostos à Anfotericina B. Os dados encontrados nesses estudos corroboram com a grande variação na sensibilidade dos isolados clínicos encontrados, mostrando que a variação na sensibilidade do *L. (L.) infantum* não é algo exclusivo dos nossos resultados.

A respeito dos isolados clínicos de *L. (L.) infantum* analisados, a maioria possui sensibilidade ao Sb^{III} e a AmB, ou seja, a amostra é composta em suma por isolados sensíveis aos fármacos utilizados contra seu desenvolvimento, mas a maioria dos pacientes não havia realizado tratamento prévio para LV quando foi coletada medula óssea, o que pode sugerir a ocorrência da circulação de parasitos naturalmente resistentes no estado do Maranhão. Vale ressaltar, que encontramos uma correlação moderada direta entre o valor do índice de resistência do Sb^{III} e AmB, isso significa que um isolado clínico sensível/resistente a um fármaco tende a apresentar sensibilidade semelhante para o outro fármaco, assim como já havia sido descrito por Vergnes *et al.* (2007), que encontraram um isolado de *L. (L.) donovani* com

resistência cruzada para o Sb^{III} , Anfotericina B e Miltefosina. Contudo, também já foi descrito esse evento em outras espécies do gênero e outros fármacos, como relata Liarte (2010) que também encontrou em sua pesquisa a ocorrência de resistência cruzada em populações de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* entre Sb^{III} e Paramomicina. Apesar desses dados serem ainda iniciais e fruto da análise em formas promastigotas, as quais tendem a adaptar-se às condições de cultura (SILVA & SACKS, 1987), revela-se uma implicação clínica importante, considerando que se trata dos dois principais fármacos utilizados no tratamento de LV em nosso país (BRASIL, 2014). Nesse sentido, em um cenário com o parasito resistente aos dois fármacos, as opções terapêuticas acabam sendo escassas e isto impacta diretamente no controle e tratamento da doença. Entretanto, vale ponderar a necessidade de melhor se estabelecer os parâmetros que designam o que é uma resistência medicamentosa para isolados clínicos de *Leishmania*, uma vez que não conseguimos encontrar na literatura uma fórmula, cálculo, classificação ou qualquer outro método que possa estabelecer um padrão para conceituar em valores/cálculos o que seria a resistência medicamentosa, encontramos somente trabalhos que determinam isso com base em um valor de EC50 maior do que o encontrado em cepas padrão cultivadas em laboratório, no entanto, cada trabalho utiliza cepas padrão diferentes e margens distintas a partir do valor de EC50 da cepa de referência para considerar a resistência a medicamentos, não sendo estabelecido uma margem mínima de segurança entre os valores para então classificar como tal. Por isso, propomos a implementação do conceito utilizado aqui para classificar a resistência medicamentosa, ou seja, em isolados clínicos de campo, a resistência medicamentosa é considerada quando o valor de EC50 desse isolado é pelo menos 2 vezes o valor da EC50 da cepa padrão utilizada.

Os nossos dados demonstraram que a sensibilidade do parasito a Sb^{III} e AmB não foi um fator que se relaciona diretamente à ocorrência de Falhas de Tratamento, Recidivas Clínicas ou sinais clínicos de agravamento da LV. Esse resultado concorda com os dados encontrados na literatura destacados em estudos mais recentes como o trabalho dos autores Takele *et al.* (2022), que afirmam que os fatores imunológicos dos hospedeiros podem estar associados a RC em pacientes com LV, como também já era relatado por Faraut-Gambarelli *et al.* (1997), que mostrou em seu estudo pacientes com isolados clínicos de *L. (L.) infantum* sensíveis ao Antimoniato e que depois de tratadas e curadas, apresentaram RC. Os autores Doenhoff *et al.* (1991) apresentaram na década de 90 o conceito da “imunodependência da quimioterapia” para *Schistosoma mansoni*, mostrando que em camundongos imunossuprimidos tratados com Antimônio, Oxamniquina, Hycanhone e Praziquantel, foi observada uma menor efetividade dos medicamentos de 15 a 56% quando comparado a camundongos imunocompetentes, e

quando um medicamento, como no caso do Oxamniquina, é administrado isoladamente, ele reduz a carga parasitária em 6 e 13%, contudo, quando esse medicamento é acompanhado de um anti-soro de coelho contra antígenos de vermes adultos, foi observada uma redução entre 52 e 66% da carga parasitária do *S. mansoni* em camundongos. Na Leishmaniose Visceral, um estudo dos autores Pérez-Cabezas *et al.* (2019), utilizou camundongos sensíveis e resistentes ao *L. donovani* e os infectou com o *L. (L.) infantum*, sendo observado que os camundongos resistentes são mais rápidos no desenvolvimento de uma resposta eficiente de células B e T que os sensíveis, e isso pode estar associado ao aumento da polifuncionalidade das células T nesses camundongos resistentes. Outro fator complicador nesse contexto é que na Leishmaniose Cutânea já foi mencionado por alguns autores, como no caso de Mendonça *et al.* (2004) que apesar de existir a cura clínica, a cura estéril raramente ocorre, sendo observada a persistência do parasito no organismo hospedeiro, mesmo que em baixa quantidade de parasitos viáveis. É nítida a grande contribuição do sistema imunológico do hospedeiro na ocorrência da recidiva clínica, assim, com base na experiência com outro parasito, o desenvolvimento de metodologias que possam contribuir para a melhora do sistema imunológico do hospedeiro em concomitância ao tratamento antileishmania, mesmo em pacientes que não tenham doença ou circunstâncias que causem imunodepressão, pode melhorar a eficácia medicamento, o sucesso terapêutico e diminuir as chances de Recidiva Clínica.

Realizamos um teste de regressão excluindo a variável sensibilidade do parasito e relacionando as variáveis gerais, clínicas e laboratoriais do hospedeiro com as ocorrências de RC e FT nos mesmos. Observamos que houve uma relação estatisticamente significativa da RC com a idade jovem, tratamento prévio, ausência de febre e altas taxas de albumina, o que está de acordo com o mencionado anteriormente, uma vez que não houve correlação da RC com a sensibilidade do parasito aos fármacos, mas houve com as variáveis do hospedeiro, considerando a idade jovem como um elemento que corresponde a uma possível imaturidade do sistema imunológico do hospedeiro (CAMPOS *et al.*, 2021), a ausência de febre como uma hipotética diminuição na capacidade de reação do sistema imunológico à infecção (MOHAN *et al.*, 2007), visto que a febre é um mecanismo natural do organismo humano para tentar eliminar microrganismos invasores (GÁRCIA-ZAPATA & JUNIOR, 2006) e um dos sintomas clássicos da ocorrência da LV (BROVKO *et al.*, 2020), assim como a alta concentração de albumina no sangue, que pode ser causada por uma desidratação e quando há estados hiperalbuminêmicos o resultado é uma proteinúria de sobrecarga (KOLTUN & COMPER, 2006). Entretanto, ao observamos a correlação da FT com os dados do hospedeiro, foi possível encontrar um resultado significativamente estatístico da FT somente com a idade e tratamento prévio, sendo

o primeiro caso explicado anteriormente, contudo, o tratamento prévio pode ser desconsiderado, uma vez que a FT é o resultado de um tratamento prévio ineficaz, ou seja, em todos os casos de FT o paciente foi previamente tratado, mas sem sucesso terapêutico. Vale considerar que apesar de não ser estatisticamente significativo, o resultado da correlação entre RC e HIV foi positiva, enquanto da FT com HIV foi negativa, o que pode ser um indicativo sobre a participação do parasito e hospedeiro em quadros de RC e FT.

Os autores Perea-Martínez *et al.* (2022), realizaram um estudo com isolados clínicos de paciente com FT de LV, cuja *L. (L.) infantum* na forma promastigota foi sensível ao Sb^{III}, Paramomicina, Miltefosina e AmB, entretanto, apesar de sensíveis, foi observado que esses parasitos ao infectar macrófagos THP-1 promoveram a modulação das funções celulares, o que pode permitir a sobrevivência ao estresse intracelular e a possibilidade de escapar das defesas do sistema imunológico, podendo dessa maneira, contribuir para a ocorrência da FT. Segundo os autores Vanaerschot *et al.* (2014), o aumento da infectividade e habilidades de manipulação do hospedeiro pelo *L. (L.) donovani*, são exemplos de epifenótipos que podem estar relacionados a FT e hipotetizam que a virulência pode ser o principal fator que corrobora para a ocorrência de FT, sendo a resistência medicamentosa um fator secundário, assim, o *Leishmania* pode persistir no organismo mesmo após o tratamento através da adaptação de suas habilidades de infectividade e/ou manipulação do hospedeiro. Um estudo realizado pelos autores Shadab *et al.* (2019), com cepas de *L. (L.) donovani* virulentas e não virulentas, mostrou que macrófagos infectados com cepas virulentas apresentam supressão da síntese de proteínas, uma regulação negativa na expressão de genes *hubs* e *hub-bottleneck* e uma regulação positiva de genes para fatores virulentos e de sobrevivência. Para os autores Pires *et al.* (2014), a virulência em *L. (L.) infantum* custa para esses parasitos um maior consumo de energia e síntese de proteínas, sendo a virulência o resultado de um possível aumento na expressão de Proteína de Membrana Cinetoplastidial-11 (KMP-11) e a metalopeptidase, as quais são relacionadas a uma melhora na eficiência da interação entre o parasito e o hospedeiro, além da degradação das proteínas protetoras do hospedeiro e peptídeos, sendo também observada a ação da enzima triparedoxina peroxidase e da proteína peroxidoxina, que protegem o parasito contra a resposta ao estresse, a proteína 14-3-3 que possibilita o aumento no tempo de vida útil do macrófago infectado, as proteínas chaperonas e endoribonuclease L-PSP que viabilizam o aumento na sobrevivência do parasito e a enzima enolase que desempenha funções versáteis na célula.

Dessa maneira, hipotetizamos que a ocorrência da FT pode estar relacionada a capacidade plástica do parasito em se multiplicar no organismo humano e fugir da ação do fármaco, ou seja, a FT observada pode estar mais associada a uma não-resposta do parasito ao

tratamento e os casos de RC podem ser relacionados ao comprometimento do sistema imunológico do hospedeiro, o que pode tornar possível o retorno de sinais e sintomas clínicos da doença. De modo geral, sustentamos a ideia de que a FT e a RC decorrem da relação de diversos fatores que envolvem o parasito e o hospedeiro simultaneamente, não de características que ocorrem de forma isoladas em cada um desses.

4.3 Implicações para o controle e tratamento da Leishmaniose Visceral

Em primeiro lugar, nossos resultados sugerem a circulação no estado do Maranhão de isolados clínicos naturalmente heterogêneos e resistentes aos fármacos aos quais lhe deveriam ser fatais, alguns com a capacidade de serem até 3x mais resistentes que a cepa padrão quando exposto a Anfotericina B, o que pode ser agravado com os resultados de que entre os isolados coletados foi encontrada uma resistência cruzada do parasito aos dois fármacos. A terapia medicamentosa continua sendo o principal mecanismo de tratamento de pessoas com a Leishmaniose Visceral, assim, a realização de estudos e estratégias que garantam a eficácia desse método é fundamental para que haja uma continuidade longínqua dessa abordagem, por isso, é preciso entender como e porque isolados clínicos têm obtido resistência aos fármacos mesmo sem nunca ter entrado em contato diretamente com eles antes, pois outros mecanismos também devem está sendo desenvolvidos (como a capacidade de virulência do parasito) e isso pode ser preocupante para o futuro de uma das populações que mais sofre com casos de LV no Brasil. Por isso, sugerimos a implementação de uma padronização na classificação da resistência medicamentosa em isolados clínicos de campos para facilitar o compartilhamento e troca de informações entre as pesquisas realizadas no estado do Maranhão.

Em segundo lugar, não encontramos nenhuma correlação da sensibilidade do parasito com a estimativa da probabilidade de morte dos pacientes, os sintomas clínicos apresentados por eles e as ocorrências de FT e RC nesses, indicando que a sensibilidade do parasito pode não ser o principal fator que interfere diretamente no desenvolvimento da LV, mas que pode estar relacionado com outros mecanismos que podem ser responsáveis pela piora do quadro clínico do paciente e o desfecho da patologia, como mostrado nos casos de aumento da virulência em *Leishmania* spp. (OUAKAD et al., 2011). Assim, sugerimos que a resistência medicamentosa pode ter menor destaque na LV, já que a grande maioria dos isolados clínicos foram sensíveis aos fármacos e mesmo assim houve episódios de FT e RC, sendo a maioria dos pacientes imunocompetentes, por isso, hipotetizamos que a resistência medicamentosa não é o principal responsável, pelo menos de maneira isolada, da piora dos sinais e sintomas clínicos nos pacientes e as ocorrências de FT e RC nesses. Dessa maneira, mapear quais mecanismos estão

envoltos nos eventos de piora do quadro clínico do paciente e episódios FT/RC, aliados com a realização de ações para prevenção, promoção, proteção e recuperação da saúde para a comunidade são cruciais e tem grande potencial para promover o controle e combate da LV no Maranhão.

Em terceiro lugar, a RC teve maior correlação com fatores relacionados ao hospedeiro, enquanto para a FT cogitamos que essa esteja mais relacionada com fatores do parasito, como a virulência. Muitos trabalhos estudam esses fenômenos de maneira isolada, buscando entender qual a participação de fatores imunológicos e genéticos do hospedeiro ou da resistência do parasito, mas muito ainda precisa ser estudado na Leishmaniose Visceral para de fato entender o que desencadeia diretamente o desenvolvimento da doença e os desfechos clínicos. Portanto, o desenvolvimento de mecanismos que possam facilitar a pesquisa com esses parasitos em laboratório, assim como o manejo na prática de pacientes com LV é de suma importância para que avanços sejam conquistados no combate a essa doença.

Por último, é essencial que a Leishmaniose Visceral deixe de ser uma doença negligenciada (PINK et al., 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022 e passe a ser encarada como o grande problema de saúde pública que é, principalmente no Brasil que é responsável quase que em absoluto por todos os casos de LV na América Latina, com a incorporação de políticas de saúde e a gestão da doença em áreas de alta endemia, como acontece no estado do Maranhão (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2021). Embora esse estudo seja preliminar, ainda pode servir como base para delimitação de outros estudos envolvendo o hospedeiro e o parasito, além de possibilitar um melhor foco na prática clínica, uma vez que frente aos desfechos clínicos de FT ou RC, uma equipe de saúde pode melhor direcionar o tratamento para a doença com foco dirigido ao hospedeiro ou ao parasito.

5. Conclusões

Concluimos que a sensibilidade do parasito aos fármacos usualmente utilizados contra a LV não foi, nessa amostra, de maneira isolada, a causa definidora de quadros clínicos como a Falha de Tratamento e a Recidiva Clínica ou sinais clínicos de agravamento em LV. Vale destacar a importância desses resultados, considerando que esta é uma pesquisa pioneira, com uma grande quantidade de isolados clínicos e uma correlação entre o *L. (L.) infantum* com as manifestações clínicas e o desfecho clínico do paciente. Contudo, considerando os limites desse estudo, mais pesquisas precisam ser realizadas para uma melhor consolidação desses resultados, incluindo as análises em amastigotas intracelulares desses isolados clínicos de *L. (L.) infantum*.

Fomento

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA.

Referências

- ABDELRAOUF, K. *et al.* Effect of multidrug resistance-conferring mutations on the fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother.** v. 66. ed. 6. 2011. p1311-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21415038/>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- ABDO, M. G. *et al.* Antimony-resistant *Leishmania donovani* in eastern Sudan: incidence and *in vitro* correlation. **Eastern Mediterranean Health Journal.** Vol. 9, No. 4, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15748080/>. Acesso: 16 ago. 2022.
- AGUIR, N. E. *et al.* La leishmaniose viscéral de l'adulte immunocompétent. À propos de six cas. **Pathologie Biologie.** 61. 2013. p54–58. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0369811412000223?casa_token=xcavUYHt118AAAAA:AVn9YhouWZfoTUiUXRFRLHSxj1924BomFZsn7RMzBhS3U52xW5foctNIOKjqaUg9FZuicoLRrQ. Acesso em: 16 ago. 2022.
- ANDRÉ *et al.* Indicadores de insegurança alimentar e nutricional associados à anemia ferropriva em crianças brasileiras: uma revisão sistemática. **Ciência e saúde coletiva**, v.23, n.4. 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/HT568nF3ZVQknXD43rCrnDh/?lang=pt>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- BABIKER, H. A. HASTINGS, Ian M & SWEDBERG, Göte. Impaired fitness of drug-resistant malaria parasites: evidence and implication on drug-deployment policies. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v.7. ed.5. 2009. p581-93. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19485798/>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- BERMUDEZ, H. *et al.* Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 100, n. 7. 2006. p.591-600. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16989685/>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- BISWAS, T. *et al.* Peroxidação lipídica de eritrócitos durante anemia de hamsters infectados com *Leishmania donovani*. **Mol Cell Biochem.** v.146. 1995, p.99-105. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7565650/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer_al.pdf. Acesso em: 16 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. 1. ed., 5. reimpr. – Brasília. 2014. p.120. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer_al_1edicao.pdf. Acesso em: 16 ago. 2022.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 16 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. – Brasília. 2005. 816 p. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf. Acesso em: 16 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde: volume único [recurso eletrônico]** 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 523p. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf. Acesso em: 16 ago. 2022.

BROVKO, M. I. *et al.* Visceral leishmaniasis: a challenging diagnosis in internal medicine. **Terapevticheskii arkhiv**, v.92, n11, 2020. p.117-121. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33720616/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

CAMPOS, M.A.G. *et al.* Is splenectomy an option for multiple relapses in a child with visceral leishmaniasis? A case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 54. 2021. p.1-3. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/9CwNLDt4dxHYrpHPP55zjqb/?lang=en&format=pdf>. Acesso em: 16 ago. 2022.

CIPRIANO, P. *et al.* Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected Patients: The Challenge of Relapse and Treatment Failure. **Acta Med Port**. 30(6). 2017. p443-448. Disponível em: <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/8291>. Acesso em: 16 ago. 2022.

CLOOTS, K. *et al.* Male predominance in reported Visceral Leishmaniasis cases: nature or nurture? a comparison of population-based with health facility-reported data. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 1-14, 29 jan. 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007995>. Acesso em: 16 ago. 2022.

- DIOTALLEVI, A. *et al.* *In Vitro* Reduced Susceptibility to Pentavalent Antimonials of a *Leishmania infantum* Isolate from a Human Cutaneous Leishmaniasis Case in Central Italy. **Microorganismos**. v.9. ed.6. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/6/1147>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- DOENHOFF, M. J. *et al.* The Immune Dependence of Chemotherapy. **Parasitology Today**, v.7, n. 1. 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15463377/>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- ESPADA, C. R. *et al.* *In Vitro* Susceptibility to Miltefosine of *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) Isolates from Different Geographical Areas in Brazil. **Microorganisms**. 9(6). 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34198947/>, Acesso m: 16 ago. 2022.
- FARAUT-GAMBARELLI, F. *et al.* *In Vitro* and *In Vivo* Resistance of *Leishmania infantum* to Meglumine Antimoniate: a Study of 37 Strains Collected from Patients with Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, n. 4. 1997. p827–830. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9087498/>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- GARCÍA-ZAPATA, M. T. & JÚNIOR, E. S. S. Aspectos fisiopatológicos da febre nas doenças infecto-parasitárias. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 4, n. 1/2, 2006. p. 111-117. Disponível em: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:abF4vV1FvoQJ:https://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/cienciasaude/article/download/26/42&cd=2&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- GARIN, YJ. *et al.* A virulência da *Leishmania infantum* é expressa como um fenótipo clonal e dominante em infecções experimentais. **Infecção e imunidade**. vol. 69,12. 2001. p.7365-73. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11705909/>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- GOTO, H. & LINDOSO, J. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, 2010. p.419- 433. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20377337/>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- GUERRA-SILVEIRA, F. & ABAD-FRANCH, F. Sex Bias in Infectious Disease Epidemiology: Patterns and Processes. **PLoS ONE** 8(4). 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23638062/>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- HENDRICKX, S. *et al.* Transmission potential of paromomycin-resistant *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v75. 2020. p951 –957. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31886863/>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- HONORÉ, S. *et al.* Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. 21(3), 1998. p231–239. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9718213/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

KOLTUN, M. & COMPER, W.D. Retention of Albumin in the Circulation is Governed by Saturable Renal Cell-Mediated Processes. **Microcirculation**, 11. 2004, p.351-360. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15280074/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

LIARTE, D. B. **Análise genômica e transcriptômica de populações de *Leishmania braziliensis* sensíveis e resistentes aos antimoniais**. 2010. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte. 2010. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/34683> Acesso em: 16 ago. 2022.

LUZ, R. I. *et al.* Drug susceptibility of *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) isolates from Brazilian HIV-positive and HIV-negative patients. **J Antimicrob Chemother.** v.66. ed. 3. 2011. p677-679. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/66/3/677/732676>. Acesso em: 16 ago. 2022.

MORIMOTO, A. *et al.* A hemofagocitose induzida pela infecção por *Leishmania donovani* é benéfica para a sobrevivência do parasita dentro dos macrófagos. **PLoS Negl Trop Dis.** 13(11). 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31738750/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

MEIRA, C. S. & GEDAMU, L. Protetor ou prejudicial? Compreendendo o papel da imunidade do hospedeiro na leishmaniose. **Microorganisms.** vol. 7. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31847221/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

MENDONÇA, M. G. *et al.* Persistence of *Leishmania* Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: is there a sterile cure?. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 189, n. 6. 2004. p.1018-1023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14999605/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

MOHAMMED, M. D. R. *et al.* Multiple Relapses of Visceral Leishmaniasis in HIV Co-Infected Patients: A Case Series from Ethiopia. **Current Therapeutic Research.** 92. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7198908/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

MOHAN, A. *et al.* A rare presentation of visceral leishmaniasis without fever or splenomegaly in an elderly person. **European Journal of Internal Medicine**, 18(2), 2007. p.158–160. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17338973/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

OLIVEIRA-NETO, M. P. *et al.* Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil—an area of *Leishmania (V.) braziliensis* transmission. **International journal of dermatology**, v. 36, n. 6. 1997. p. 463-468. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9248897/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - WHO. Technical Report Series 949. **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf;jsessionid=528A345D021696FAE84536A9CFE1FDF6?sequence=1. Acesso em: 16 ago. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniose**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_2. Acesso em: 16 ago. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Organização Pan-Americana de Saúde. **Leishmaniose – Informe epidemiológico das Américas**. n10. 2021. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386>. Acesso em: 16 ago. 2022.

OOUAKAD, M. *et al.* Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. **Parasitology**, v.138. ed.11. 2011. p1392-1399. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21819638/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

PADRÓN-NIEVES M. & PONTE-SUCRE A. Cellular Markers for the Identification of Chemoresistant Isolates in *Leishmania*. In: Michels P., Ginger M., Zilberstein D. (eds) Trypanosomatids. **Methods in Molecular Biology**, vol. 2116. Humana, New York, NY. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32221953/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

PALACIOS, R. *et al.* Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania viannia* species. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 64, n. 3. 2001. p.187-193. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11442216/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

PASQUAU, F. *et al.* Leishmaniasis as an opportunistic infection in HIV-infected patients: determinants of relapse and mortality in a collaborative study of 228 episodes in a Mediterranean region. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 24. 2005. p411–418. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-005-1342-6>. Acesso em: 16 ago. 2022.

PASTORINO, A. C. *et al.* Leishmaniose Visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria** [online]. v. 78, n. 2. 2002. p.120-127. Disponível: <https://www.scielo.br/j/jped/a/7MHkFCnXG43DBHGHNHJ5s6w/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 16 ago. 2022.

PATHIRANA, S.L *et al.* ABO-blood-group types and protection against severe, *Plasmodium falciparum* malaria. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**. v.99. n.2. 2013. p119-124. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15814030/#:~:text=The%20cases%20of%20severe%20malaria,severe%20disease%20caused%20by%20P>. Acesso: 16 ago. 2022.

PATINO, LH. MUSKUS, C. & RAMÍREZ, JD. Respostas transcricionais de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na presença de estibogluconato de sódio trivalente. **Vetores de parasitas**. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31300064/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

PÉREZ-CABEZAS, B. *et al.* Understanding Resistance vs. Susceptibility in Visceral Leishmaniasis Using Mouse Models of *Leishmania infantum* Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v.9. 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2019.00030/full>. Acesso em: 16 ago. 2022.

- PEREA-MARTÍNEZ, A. *et al.* Transcriptomic Analysis in Human Macrophages Infected with Therapeutic Failure Clinical Isolates of *Leishmania infantum*. **ACS Infectious Diseases**. 8 (4). 2022. p800-810. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.1c00513>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- PINK, R. *et al.* Opportunities and Challenges in Antiparasitic Drug Discovery. **Nat Rev Drug Discov**. 4, 2005. p727–740. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd1824>. Acesso em: 27 jun 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd1824>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- PIRES, S. F. *et al.* Identification of Virulence Factors in *Leishmania infantum* Strains by a Proteomic Approach. **Journal of Proteome Research**, v.13. ed.4. 2014. p1860–1872. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr400923g>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- PONTE-SUCRE, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS NTD**, v. 11, n. 12. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29240765/>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 227–250, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23317043/>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- RESENDE, S. S. *et al.* Increased susceptibility of blood type O individuals to develop anemia in *Plasmodium vivax* infection. **Infection, Genetics and Evolution**. 2017. p87–92. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567134817300722>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- ROMERO, G. A. *et al.* Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L.(V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 5. 2001. p.456-465. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11303265/>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- RUGANI, J. N. *et al.* Antimony resistance in *Leishmania (Viannia) braziliensis* clinical isolates from atypical lesions associates with increased ARM56/ARM58 transcripts and reduced drug uptake. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** [online]. v. 114. 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/FxykJBN5NDfKncSFbKCDw7r/abstract/?lang=en>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- RUIZ-POSTIGO, J. A. *et al.* "Global leishmaniasis surveillance: 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap/Surveillance mondiale de la leishmaniose: 2019-2020, une periode de reference pour la feuille de route a l'horizon 2030." **Weekly Epidemiological Record**, vol. 96, no. 35, 3 Sept. 2021, pp. 401+. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9635-401-419>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. R., & MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. New York. 1989.
- SCHÖNIAN, G. *et al.* PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2003; 47: 392 349-58. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12967749/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SHADAB, M. *et al.* RNA-Seq Revealed Expression of Many Novel Genes Associated With *Leishmania donovani* Persistence and Clearance in the Host Macrophage. **Front Cell Infect Microbiol.** v.9. ed.17. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30805314/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SILVA, W. F. *et al.* Manifestações Hematológicas Agudas da Leishmaniose Visceral com Infiltração Medular: Relato de Caso. **Hematology transfusion and cell therapy.**43(S1):S1–S546. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2531137921002315>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SILVA, A. R. *et al.* Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral, na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical [online].** v. 41, n. 4. 2008. p.358-364. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/c6436tZVng4WCWvjMcvNc5g/?lang=pt>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SILVA, R. SACKS, DL. Metacyclogenesis is a *major* determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. **Infect Immun.** 55(11). 1987. p2802-6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC259980/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SIMÃO, J. C. VICTÓRIA, C. & FORTALEZA, C. M. C. B. Predictors of relapse of visceral leishmaniasis in inner São Paulo State. Brazil. **International Journal of Infectious Diseases.** 95. 2020. p.44–49. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971220300862>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SINAN. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral - situação epidemiológica. 2018. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvma.def>>. Acesso em: 16 ago. 2020.

SUNDAR, S. *et al.* Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clinical infectious diseases,** v. 31, n. 4, p. 1104-1107, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11049798/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine International Health,** v. 6, n. 11. 2001. p.849–854. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11703838/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

TAKELE, Y. *et al.* Immunological factors, but not clinical features, predict visceral leishmaniasis relapse in patients co-infected with HIV. **Cell Reports Medicine.** v3. ed1. 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666379121003591>. Acesso em: 16 ago. 2022.

TEIXEIRA, A. C. *et al.* Failure of both azithromycin and antimony to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** v. 50, n. 3. 2008. p.157-160. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rimts/a/LXJd94FQGmg8fMvZkM3WpCj/?lang=en>. Acesso em: 16 ago. 2022.

TOEPP, A. J. *et al.* As infecções comórbidas induzem a progressão da Leishmaniose Visceral. **Parasitas e vetores**. vol. 12,1 54. 2019. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-019-3312-3>. Acesso em: 16 ago. 2022.

TUNES, L. G. *et al.* The mutation G133D on *Leishmania guyanensis* AQP1 is highly destabilizing as revealed by molecular modeling and hypo-osmotic shock assay. **BBA - Biomembranes**. v.1863. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34175297/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

ULIANA, S. R. B.; TRINCONI, C. T. & COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: Present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4. 2018. p.464–480. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28103966/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

VANAERSCHOT, M. *et al.* Drug-resistant microorganisms with a higher fitness – can medicines boost pathogens?. **Critical Reviews in Microbiology**, v.39. ed.4. 2012. p.384–394. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22950457/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

VANAERSCHOT, M. *et al.* Linking *In Vitro* and *In Vivo* Survival of Clinical *Leishmania donovani* Strains **PLoS ONE**. v.5. ed.8. 2010. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0012211>. Acesso em: 16 ago. 2022.

VANAERSCHOT, M. *et al.* Treatment failure in leishmaniasis: drug-resistance or another (epi-) phenotype?. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.** v.12. ed.8. 2014. p937–946. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24802998/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

VERGNES, B. *et al.* A Proteomics Screen Implicates HSP83 and a Small Kinetoplastid Calpain-related Protein in Drug Resistance in *Leishmania donovani* Clinical Field Isolates by Modulating Drug-induced Programmed Cell Death*. **Molecular & Cellular Proteomics**. v6. ed 1. 2007. pP88-101. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17050524/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

VIEIRA, R.C.S. & FERREIRA, H. S. Prevalência de anemia em crianças brasileiras, segundo diferentes cenários epidemiológicos. **Revista de nutrição**, v.23, n.3. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rn/a/YXYsyLm68gJ5t9ywxQKSrvJ/abstract/?lang=en>. Acesso em: 16 ago. 2022.

ZAULI-NASCIMENTO, R. C. *et al.* *In vitro* sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Trop Med Int Health**. 2010; 15: p.68-76. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19874570/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

WILLIAMSON, A. Mary & SNYDER, L. Michael. **Wallach**: interpretação de exames laboratoriais. Tradução: Maria de Fátima Azevedo, Patricia Lydie Voeux. – 10. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **The road to 2030**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-UCN-NTD-SAI-2022.2>. Acesso em: 16 ago. 2022.

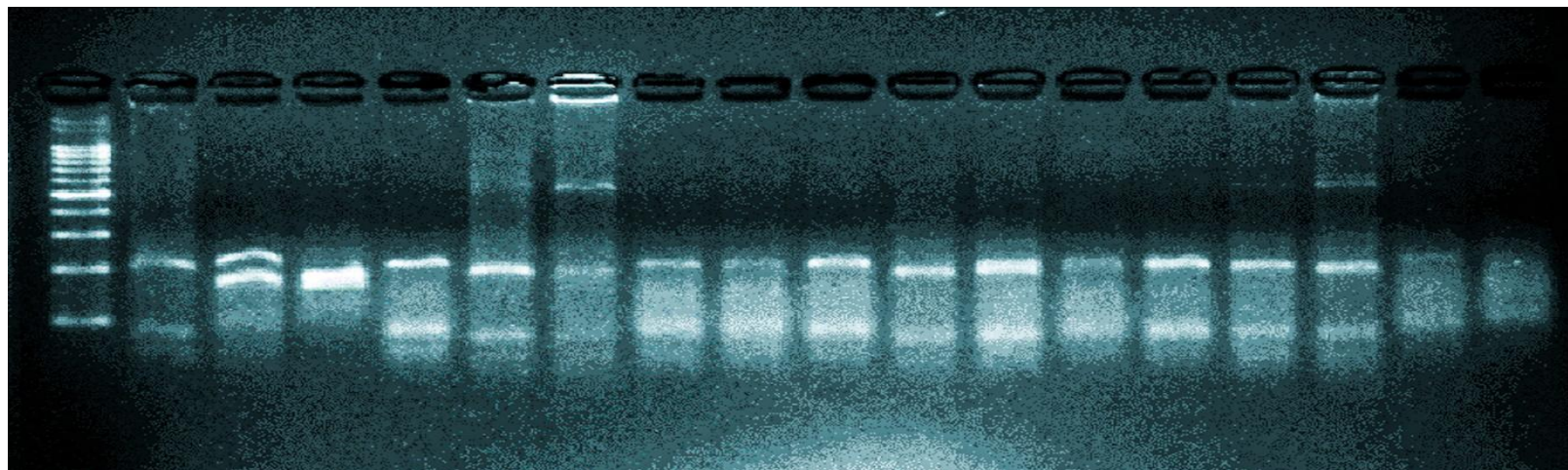
FIGURAS:M - *Li* - *La* - *Lb* - 06 - 07 - 08 - 09 - 20 - 21 - 27 - 28 - 44 - 56 - 81 - 92 - 93 - CN

Figura 1. Identificação e caracterização dos isolados clínicos de pacientes com Leishmaniose Visceral. M: Marcador molecular; *Li*: Controle de *Leishmania infantum*; *La*: Controle de *Leishmania amazonenses*; *Lb*: Controle de *Leishmania braziliensis*; 06 a 93: Isolados Clínicos e CN: Controle Negativo.

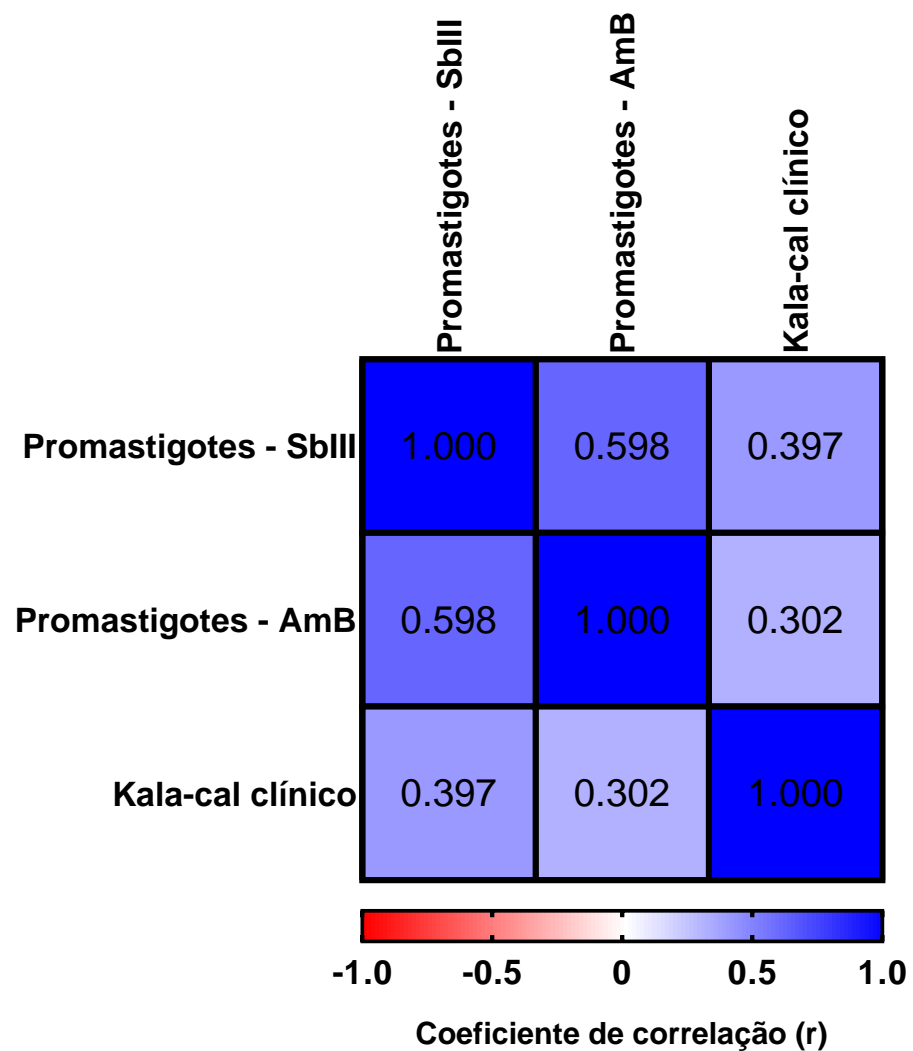


Figura 2. Matriz de correlação linear entre os valores dos testes de sensibilidade e o escore Kala-cal clínico. Variação das cores do mapa de calor (*heat map*) representa o coeficiente de correlação.

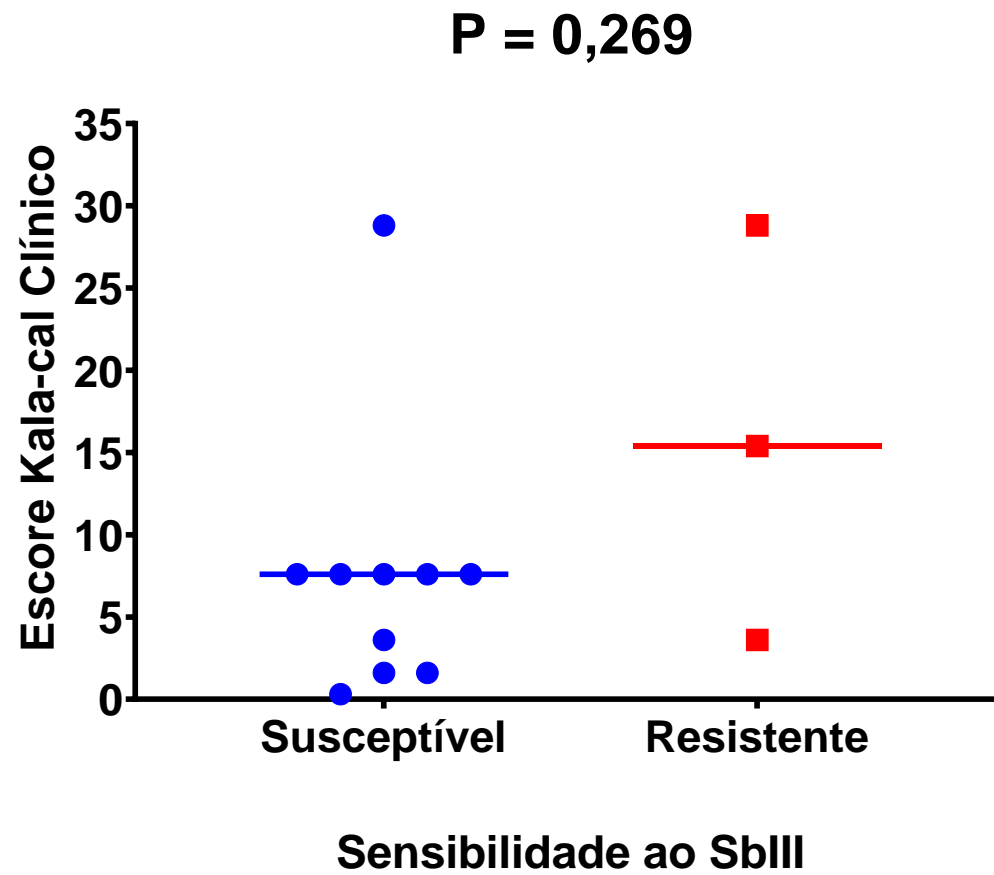


Figura 3. Análise comparativa do escore Kala-cal clínico entre os isolados clínicos categorizados como susceptíveis e resistentes ao Antimônio Trivalente. A linha representa a mediana.

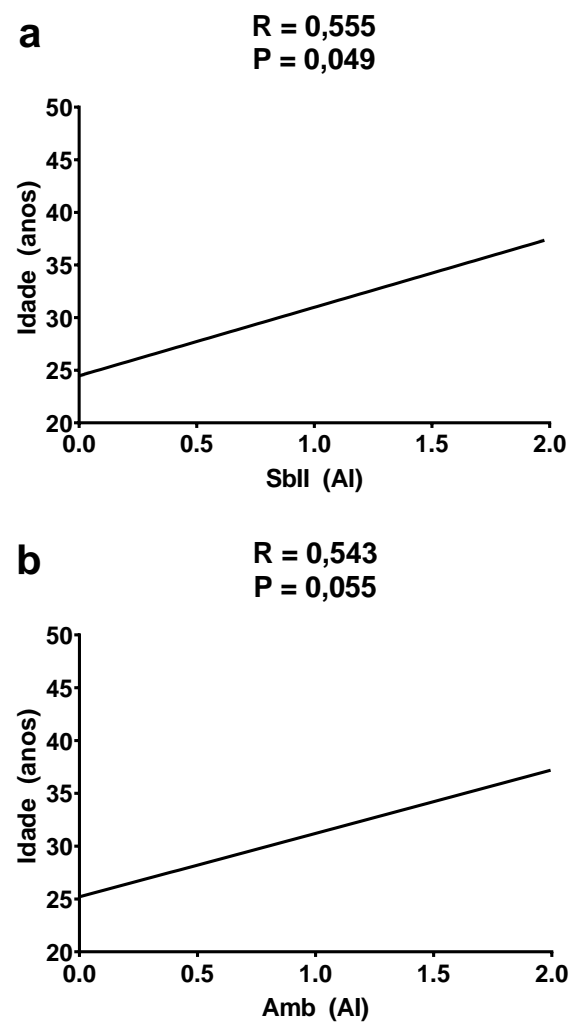


Figura 4. Análise de correlação entre idade dos pacientes dos quais foram coletados os isolados clínicos e a sensibilidade desses isolados clínicos ao Antimônio Trivalente e a Anfotericina B.

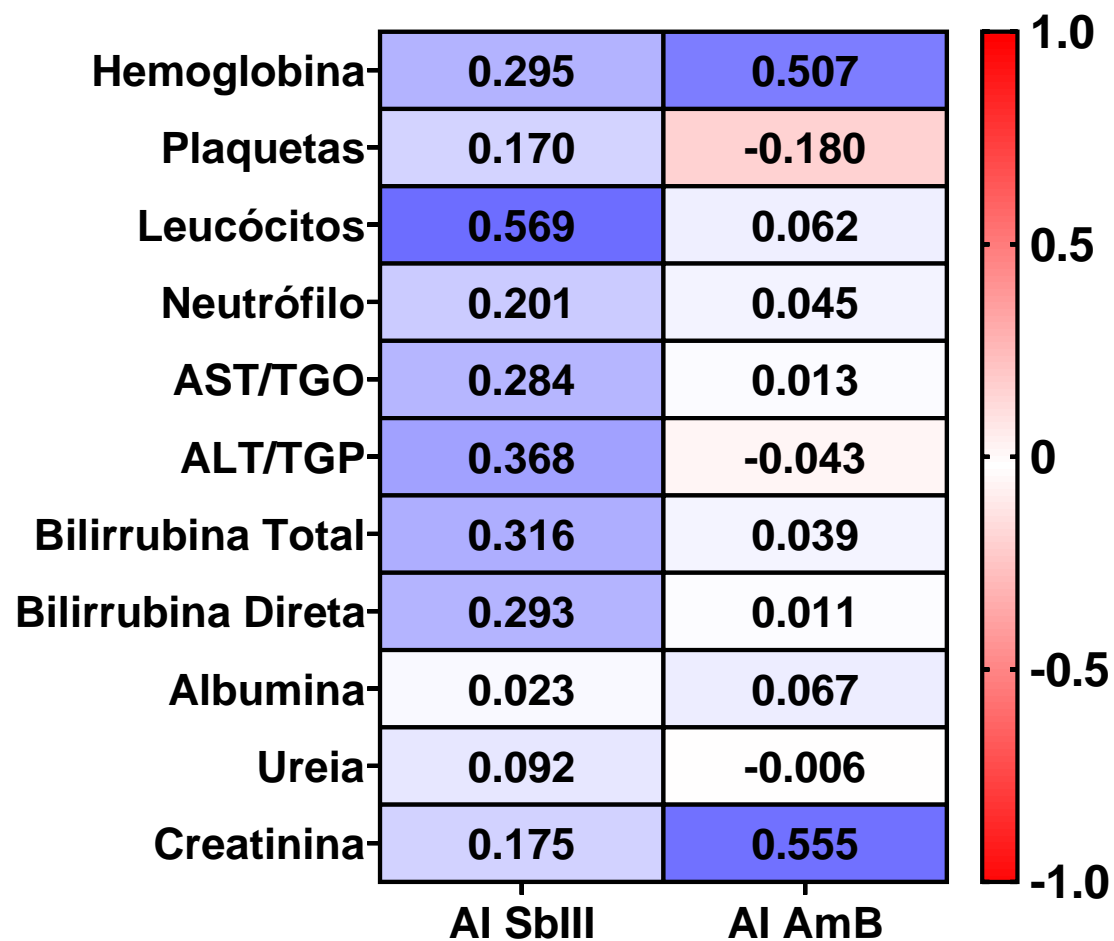


Figura 5. Matriz de correlação linear entre os valores dos testes de sensibilidade ao Antimônio Trivalente e a Anfotericina B e as medidas séricas coletadas. Variação das cores do mapa de calor (*Heat map*) representa o coeficiente de correlação.

TABELAS:**Tabela 1.** Perfil demográfico e clínico dos pacientes com Leishmaniose Visceral incluídos no presente estudo.

Caso	Variáveis demográficas			Dados do tratamento da Leishmaniose				
	Sexo/Idade	Município	HIV+	Tratamento Prévio	Tratamento Após a Coleta	Falha de Tratamento	Recidiva	Desfecho Clínico
01	M/37	São Luís	Não	Não	AM	Não	Não	Cura
02	M/32	São Luís	Sim	Não	LAmB	Não	Não	Cura
03	F/48	Santa Inês	Sim	Não	LAmB, LAmB, LAmB, LAmB, LAmB	Não	Não	Cura
04	M/41	Bacabal	Sim	Sim	AM e LAmB	Não	Não	Cura
05	M/43	São Vicente de Ferrer	Não	Não	AM	Não	Não	Cura
06	M/29	Anapurus	Não	Não	LAmB	Não	Não	Cura
07	M/40	São Luís	Não	Não	AmB	Sim	Não	Cura
08	M/33	Santa Inês	Sim	Não	LAmB, LAmB	Não	Não	Cura
09	M/22	São Luís	Não	Sim	AM e LAmB	Sim	Não	Cura
10	F/35	Colinas	Não	Não	LAmB	Não	Não	Desconhecido
11	M/10	Itapecuru Mirim	Não	Sim	PEN, MIL, LAmB	Sim	Sim	Cura
12	M/29	Paço do Lumiar	Sim	Sim	LAmB	Sim	Sim	Em profilaxia
13	M/20	São José de Ribamar	Sim	Sim	AM	Sim	Sim	Em profilaxia

M = Masculino; F = Feminino; HIV = Vírus da Imunodeficiência Humana; LAmB = Anfotericina B Lipossomal; AM = Antimoniato de Meglumina; PEN = Pentamidina; MIL = Miltefosina.

Tabela 2. Sinais e sintomas clínicos apresentados pelos pacientes com Leishmaniose Visceral incluídos na amostra do presente estudo.

Caso	Febre	Espleno- megalia	Hepato- megalia	Anemia	Diarreia	Icterícia	Palidez	Presença de Edema	Vômito	Dispne- ia	Infecção Bacteriana
01	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
02	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
03	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
04	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não
05	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
06	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
07	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
08	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
09	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não
10	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
11	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
12	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
13	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não

Tabela 3. Dados dos marcadores séricos dos pacientes incluídos na amostra

Caso	Hemo- globina (g/dL)	Plaquetas (mm³)	Leucócitos (mm³)	Neutrófilo (mm³)	AST/ TGO (UL)	ALT/ TGP (UL)	Bil. Total (mg/dL)	Bil. Direta (mg/dL)	Albumina (g/dL)	Ureia (mg/ dL)	Creatinina (mg/dL)
01	8,9	110.000	2.300	-	-	-	-	-	-	-	0,9
02	7,8	113.000	1.038	524	55	54	1,1	0,6	3,2	14	0,80
03	12,4	65.000	1.500	86.0	24	14	1,3	0,7	3	23	1,12
04	8,0	148.000	3.360	2.417	33	14	1,3	0,5	2,66	24	0,81
05	8,9	150.000	3.200	1.230	78	60	1,5	0,9	2,7	47	0,8
06	6,5	522.000	5.070	-	1.616	140	16,7	11,15	2,2	82	1,14
07	10,1	62.000	3.100	1.540	50	55	-	-	2,5	25	0,9
08	6,3	111.000	1.420	776	38	18	2,2	1,86	2,27	17	0,20
09	6,3	140.000	950	348	212	40	1,06	0,44	2,7	57	1,54
10	11,0	140.000	3.259	2.460	34	30	-	-	3,2	45	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	10,6	191.000	2.070	1.358	17	14	0,37	0,17	3,4	26	0,6
13	11,4	206.000	3.750	879	18	9.54	0,32	0,1	3,7	0,92	0,65

AST/TGO = Aspartato Aminotransferase/Transaminase Oxalacética; ALT/TGP = Alanina Aminotransferase/Transaminase Pirúvica; Bil. Total = Bilirrubina Total; Bil. Direta = Bilirrubina Total.

Tabela 4. Resultado do teste de sensibilidade das formas promastigotas ao Antimônio Trivalente e a Anfotericina B, e o cálculo do escore Kala-cal Clínico nos casos incluídos no estudo.

Cepa/Isolado Clínico	Promastigotas - Sb ^{III}				Promastigotas - AmB			Kala-cal clínico	
	Caso	Sb ^{III} EC50 (μM)	AI	Sensibilidade	AmB EC50 (nM)	AI	Sensibilidade	Escore	%
MHOM/BR/74/PP75 (ref strain)	-	66.7 ± 1.6	-	-	175.8 ± 3.7	-	-	-	-
MHOM/BR/2018/PV006-MA	01	120 ± 5,3	1,8	Susceptível	269,9 ± 2,2	1,5	Susceptível	2/13	1,6%
MHOM/BR/2018/PV007-MA	02	94,7 ± 0,8	1,4	Susceptível	146,9 ± 30,5	0,8	Susceptível	4/13	7,6%
MHOM/BR/2018/PV008-MA	03	133,8 ± 14,1	2,0	Resistente	622,4 ± 16,8	3,5	Resistente	5/13	15,4%
MHOM/BR/2018/PV009-MA	04	109,2 ± 6,2	1,6	Susceptível	243,5 ± 21,3	1,4	Susceptível	6/13	28,8%
MHOM/BR/2019/PV020-MA	05	155,2 ± 3,6	2,3	Resistente	118,9 ± 14,7	0,7	Susceptível	3/13	3,6%
MHOM/BR/2019/PV021-MA	06	142,4 ± 6,0	2,1	Resistente	233,1 ± 27,3	1,3	Susceptível	6/13	28,8%
MHOM/BR/2019/PV027-MA	07	90,7 ± 6,4	1,3	Susceptível	321,1 ± 4,6	1,8	Susceptível	4/13	7,6%

MHOM/BR/2019/PV028-MA	08	42,5 ±13,6	0,6	Susceptível	48,1 ±9,9	0,3	Susceptível	4/13	7,6%
MHOM/BR/2019/PV044-MA	09	51,1 ±8,1	0,8	Susceptível	231,1 ±14,1	1,3	Susceptível	3/13	3,6%
MHOM/BR/2020/PV056-MA	10	77,4 ±3,2	1,1	Susceptível	248,9 ±4,7	1,4	Susceptível	2/13	1,6%
MHOM/BR/2021/PV081-MA	11	31,7 ±17,5	0,5	Susceptível	141,4 ±23,7	0,8	Susceptível	0/13	0,3%
MHOM/BR/2021/PV092-MA	12	35,1 ±21,0	0,5	Susceptível	78,9 ±6,9	0,4	Susceptível	4/13	7,6%
MHOM/BR/2018/PV093-MA	13	131,3 ±3,6	1,9	Susceptível	271,9 ±0,9	1,5	Susceptível	4/13	7,6%

Sb^{III} = Antimônio Trivalente; AmB = Anfotericina B; EC50 = Concentração Efetiva do fármaco que inibe 50% da população de Leishmania. μ M = Micromolar; nM = Nanomolar; AI = Índice de Atividade.

Tabela 5. Análise de correlação linear entre os valores de sensibilidade das formas promastigotas ao Antimônio Trivalente e a Anfotericina B e do escore Kala-cal clínico.

Variáveis	AI Sb ^{III}		AI AmB		Kala-cal clínico	
	R (IC 95%)	P valor	R (IC 95%)	P valor	R (IC 95%)	P valor
AI Sb ^{III}	1,000		R = 0,598 (0,06 a 0,86)	0,031*	R = 0,397 (-0,19 a 0,77)	0,179
AI AmB	R = 0,598 (0,06 a 0,86)	0,031*	1,000		R = 0,302 (-0,29 a 0,73)	0,315
Kala-cal clínico	R = 0,397 (-0,19 a 0,77)	0,179	R = 0,302 (-0,29 a 0,73)	0,315	1,000	

AI = Índice de Atividade; Sb^{III} = Antimônio Trivalente; AmB = Anfotericina B; R = Coeficiente de correlação de Pearson; IC 95% = Intervalo de Confiança a 95%. *Medida de correlação estatisticamente significativa (P < 0,05).

Tabela 6. Análise de correlação linear entre os valores de sensibilidade das formas promastigotas ao Antimônio Trivalente e a Anfotericina B e das medidas séricas.

Marcadores séricos	AI Sb ^{III}		AI AmB	
	R (IC 95%)	P valor	R (IC 95%)	P valor
Hemoglobina	R = 0,295 (-0,06 a 0,84)	0,351	R = 0,507 (-0,09 a 0,83)	0,092
Plaquetas	R = 0,170 (-0,44 a 0,67)	0,597	R = -0,180 (-0,68 a 0,43)	0,576
Leucócitos	R = 0,569 (-0,01 a 0,86)	0,053	R = 0,062 (-0,53 a 0,61)	0,848
Neutrófilo	R = 0,201 (-0,49 a 0,73)	0,577	R = 0,045 (-0,60 a 0,65)	0,902
AST/TGO	R = 0,284 (-0,38 a 0,75)	0,397	R = 0,013 (-0,59 a 0,60)	0,969
ALT/TGP	R = 0,368 (-0,29 a 0,79)	0,266	R = -0,043 (-0,62 a 0,57)	0,900
Bilirrubina Total	R = 0,316 (-0,44 a 0,81)	0,407	R = 0,039 (-0,64 a 0,68)	0,920
Bilirrubina Direta	R = 0,293 (-0,46 a 0,80)	0,444	R = 0,011 (-0,65 a 0,67)	0,978
Albumina	R = 0,023 (-0,58 a 0,61)	0,946	R = 0,067 (-0,55 a 0,67)	0,844

Ureia	R = 0,092 (-0,53 a 0,65)	0,787	R = -0,01 (-0,60 a 0,59)	0,987
Creatinina	R = 0,175 (-0,47 a 0,70)	0,607	R = 0,555 (-0,06 a 0,86)	0,076

R = coeficiente de correlação de Pearson. IC 95% = intervalo de confiança a 95%.

Tabela 7. Análise comparativa dos valores do teste de sensibilidade das formas promastigotas ao Antimônio Trivalente e a Anfotericina B de acordo com os desfechos Falha de Tratamento e Recidiva Clínica na Leishmaniose Visceral.

Teste	Falha terapêutica						P	Recidiva						P
	Sim			Não				Sim			Não			
	mediana	1º quartil	3º quartil	mediana	1º quartil	3º quartil		mediana	1º quartil	3º quartil	mediana	1º quartil	3º quartil	
Sb ^{III}	0	0	1.3	1.7	1.32	2.02	0.575	0	0	0.95	1.5	1.15	1.95	0.400
AmB	1.3	0	1.5	1.35	0.775	1.42	0.100	0	0	0.75	1.35	0.925	1.48	0.433

Tabela 8. Análise de regressão das variáveis clínicas sobre a sensibilidade das formas promastigotas ao Antimônio Trivalente ajustada para idade.

Variáveis	Coefficiente de regressão (β)	Erro padrão (SE)	t	P valor
Tratamento prévio	0,243	0,602	0,404	0,694
Falha de Tratamento	-0,466	0,578	-0,806	0,439
Recidiva	0,090	0,733	0,123	0,905
Febre	-1,471	0,790	-1,863	0,092
Esplenomegalia	0,255	1,095	0,233	0,821
Hepatomegalia	0,243	0,842	0,289	0,778
Diarreia	-0,501	0,480	-1,044	0,321
Icterícia	1,159	0,763	1,518	0,160
Palidez	-0,061	0,709	-0,086	0,933
Edema	-0,839	0,841	-0,997	0,342
Vômito	0,477	0,607	0,786	0,450
Dispneia	0,630	0,594	1,061	0,314
Infecção	1,159	0,763	1,518	0,160

Tabela 9. Análise de regressão das variáveis clínicas sobre a sensibilidade das formas promastigotas a Anfotericina B ajustada para idade.

Variáveis	Coefficiente de regressão (β)	Erro padrão (SE)	t	P valor
Tratamento prévio	0,724	0,607	1,190	0,261
Falha de Tratamento	0,395	0,626	0,631	0,542
Recidiva	-0,127	0,784	-0,163	0,874
Febre	-1,095	0,917	-1,194	0,260
Esplenomegalia	0,141	1,174	0,120	0,907
Hepatomegalia	-0,103	0,903	-0,114	0,911
Diarreia	-0,084	0,540	-0,156	0,879
Icterícia	0,316	0,900	0,352	0,732
Palidez	0,333	0,750	0,444	0,667
Edema	0,751	0,913	0,823	0,430
Vômito	0,321	0,661	0,486	0,638
Dispneia	0,053	0,670	0,079	0,938
Infecção	0,316	0,900	0,352	0,732

Tabela 10. Associação dos fatores gerais, clínicos e laboratoriais com os desfechos Falha de Tratamento e Recidiva Clínica.

Variáveis	Falha terapêutica		P	Recidiva LV		P
	β	SE		β	SE	
Dados gerais						
Idade	-0,03	0,01	0,020*	-0,02	0,01	0,009*
Sexo masculino	0,45	0,38	0,260	0,27	0,34	0,443
Dados clínicos						
HIV	-0,09	0,29	0,751	0,19	0,24	0,459
Tratamento prévio	0,67	0,22	0,011*	0,60	0,18	0,009*
Febre	-0,72	0,34	0,057	-0,90	0,22	0,002*
Esplenomegalia	-0,66	0,51	0,220	-0,83	0,40	0,064
Hepatomegalia	0,41	0,53	0,453	0,25	0,47	0,606
Diarreia	-0,30	0,28	0,314	-0,37	0,23	0,139
Icterícia	-0,41	0,53	0,453	-0,25	0,47	0,606
Palidez	-0,13	0,40	0,742	-0,31	0,33	0,368
Edema	0,66	0,51	0,220	-0,25	0,47	0,606
Vômito	0,13	0,40	0,742	-0,27	0,34	0,443
Dispneia	-0,45	0,38	0,260	-0,27	0,34	0,443
Infecção	-0,41	0,53	0,453	-0,25	0,47	0,606
Dados laboratoriais						
Hemoglobina	EP = 0,205		0,522	EP = 0,442		0,150
Plaquetas	EP = -0,082		0,800	EP = 0,137		0,672
Leucócitos	EP = 0,427		0,166	EP = -0,135		0,677
Neutrófilo	EP = 0,112		0,758	EP = 0,269		0,451
AST/TGO	EP = 0,322		0,334	EP = -0,289		0,389
ALT/TGP	EP = -0,233		0,490	EP = -0,379		0,251
Bilirrubina Total	EP = -0,329		0,387	EP = -0,275		0,474
Bilirrubina Direta	EP = -0,337		0,375	EP = 0,271		0,481
Albumina	EP = 0,349		0,293	EP = 0,712		0,014*
Ureia	EP = -0,193		0,570	EP = -0,417		0,202
Creatinina	EP = 0,145		0,671	EP = -0,340		0,306
Escore Kala-cal	EP = -0,344		0,242	EP = -0,252		0,405

β = coeficiente de regressão.

SE = erro padrão.

EP = estimativa padronizada.

*Estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados em ambos os capítulos dessa dissertação podem contribuir para o enfrentamento das Leishmanioses, visto que, embora limitados, possibilitam compreender melhor as possíveis relações entre o parasito e a ocorrência de Falhas de Tratamento e Recidivas Clínicas. Colaborando, dessa forma, com outros estudos disponíveis na literatura que ajudam a elucidar as ocorrências da FT e RC, contribuindo na elaboração de estratégias que visem o controle, a prevenção e o tratamento da doença em função da qualidade de vida da população e dos impactos na saúde pública em geral, sendo fundamental a continuação desses estudos para garantir o combate a essa doença negligência no Brasil e no mundo.

É importante destacar o pioneirismo desse trabalho na literatura, considerando a relevância do estudo de características do parasito como a sensibilidade aos diferentes fármacos e a maneira que essa sensibilidade pode ou não influenciar nas manifestações clínicas dos pacientes, além de seu desfecho clínico na Leishmaniose Visceral. Além disso, o tamanho amostral de isolados clínicos de *L. (L.) infantum* componentes dessa pesquisa também é inovador, não sendo encontrado na literatura outras propostas com uma amostragem tão significativa de isolados clínicos testados com multidrogas.

Assim, essa dissertação é fruto de muito esforço e dedicação, resultado de muitos dias em experimentos laboratoriais constantes e outros tantos em busca de informações na literatura que pudessem nortear e embasar a realização dessa.

PERSPECTIVAS

Considerando o atual cenário da Leishmaniose na atualidade, com isolados clínicos mais resistentes, mais aptos, a diminuição da eficácia e da quantidade de fármacos disponíveis para tratamento, os casos de recidiva e falha de tratamento, é de suma importância o desenvolvimento de novos estudos que possam entender completamente a *Leishmania* e a forma com essa interage com os medicamentos e no organismo humano, assim como para elaboração de novos fármacos mais eficientes e com um menor número de eventos adversos. Como apresentado e discutido ao longo dessa pesquisa, existem fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro humanos que corroboram na ocorrência de FT e RC, sendo essas uma correlação de vários fatores concomitantes e não características isoladas. Entretanto, várias questões sobre a ocorrência de FT e RC precisam ser respondidas, pois, apesar dos resultados aqui alcançados, mais experimentos laboratoriais precisam ser realizados, como teste com a

sensibilidade desses isolados clínicos na forma de amastigotas, incluindo a correlação desses amastigotas com as variáveis clínicas coletas. Assim, por meio dessas abordagens, espera-se entender a participação da sensibilidade dos isolados clínicos aqui apresentados, assim como todos os dados e informações vinculadas ao paciente e os parasito nas ocorrências de FT e RC, e que isso encoraje a utilização e o desenvolvimento de pesquisas com variáveis e abordagens ainda não exploradas na literatura para a real e completa compreensão da LV e o papel das partes envolvidas, para que, futuramente, a recidiva e a falha de tratamento sejam desfechos clínicos que possam ser previstos e evitados.

ANEXOS**ANEXO - I****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****INFORMAÇÕES PARA OS PACIENTES, RESPONSÁVEIS E FAMILIARES**

Você está sendo convidado a participar voluntariamente do projeto de pesquisa **“AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA SUCEPTIBILIDADE À FÁRMACOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Leishmania spp.* OBTIDOS EM UMA ÁREA ENDÊMICA DE LEISHMANIOSES”**

Leia atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento. No caso de não entender qualquer que seja o item peça mais esclarecimento e só assine após ter certeza de ter esclarecido todas as suas dúvidas.

Justificativa e objetivos do estudo

A leishmaniose, conhecida popularmente como calazar, esplenomegalia tropical ou febre dundun, ocorre quando um mosquito pica um animal infectado a fim de se alimentar e acaba ingerindo os parasitas. Ao picar uma pessoa, o mosquito transfere o parasita para seu organismo. Qualquer pessoa está sujeita a ser picada por esses mosquitos e há um número muito grande de casos da doença no estado do Maranhão, atingindo tanto adultos quanto crianças. É muito importante que a doença seja descoberta o mais cedo possível, pois, quanto mais tardio o diagnóstico maior será o dano provocado pela infecção. O Glucantime® é o principal fármaco utilizado no tratamento da doença, mas algumas pessoas não estão respondendo a medicação. Quando isso ocorre é necessário que o paciente use outros fármacos. Por isso, com esse trabalho vamos poder entender por que em alguns pacientes o Glucantime® e outros fármacos não funcionam e assim nós poderemos descobrir mais cedo se isso em quais indivíduos esses fármacos não vão funcionar.

De que forma posso auxiliar neste estudo?

Você pode auxiliar autorizando que o material resultante do mielograma para análise e os resultados dos exames possam ser utilizados nesta pesquisa.

Quais os riscos e limites que podem ser encontrados nos exames?

Sua coleta possui variantes de acordo com o local escolhido, como opções utilizadas temos os ossos esterno, localizado no tórax, a crista ilíaca, localizada na região da bacia, ou a tíbia, localizada na perna, tomando os devidos cuidados na colocação da agulha. Recomenda-se que as agulhas utilizadas sejam específicas para esta finalidade. A área escolhida para coleta será devidamente esterilizada, fazendo uma pressão firme com movimentos rotativos para penetrar a agulha na região cortical do osso. Esse procedimento dura em torno de 40 minutos.

Como o paciente estará anestesiado não deverá sentir nenhum tipo de desconforto. O procedimento de coleta da medula óssea é seguro, contudo, podem ocorrer complicações relacionadas à anestesia e à coleta propriamente dita, como dor local, que é facilmente controlada com uso de analgésicos comuns.

Os resultados obtidos para essa pesquisa são absolutamente confidenciais, portanto, serão comunicados somente à pessoa ou responsável e ao profissional médico que acompanha o paciente. A comunicação dos resultados a terceiros só poderá ser realizada mediante autorização do interessado.

Como será feita esta pesquisa?

As pessoas serão convidadas a participar da pesquisa. Receberão uma cópia deste documento que deverá ser lido, entendido e assinado. Os participantes serão atendidos pelo médico que fará algumas perguntas, examinará o paciente e, se necessário, poderá solicitar alguns exames complementares.

Quais os benefícios e malefícios deste estudo?

Não haverá nenhuma vantagem direta, tal como remuneração, com a participação neste estudo, porém, os resultados poderão ajudar a desenvolver um teste que possa dizer em quais pacientes os principais fármacos utilizados no tratamento da Leishmaniose não tem efeito, o que poderá beneficiar a população em geral no que diz respeito ao controle dessa doença.

O material biológico coletado será usado exclusivamente para fins desta pesquisa. Os dados científicos desta pesquisa serão divulgados em meio científico, porém a sua identidade e seus dados pessoais serão preservados.

O que vai ser feito com o material e os dados coletados de cada paciente?

O material e a ficha-protocolo com resultados dos exames dos pacientes serão armazenados no laboratório de Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do

Maranhão (UFMA). As amostras serão registradas por números, para evitar identificação dos pacientes. A identificação dos pacientes será mantida em sigilo absoluto e estará sob a guarda dos pesquisadores responsáveis.

A pessoa ou responsável legal poderá escolher entre ser informado ou não dos resultados do estudo; aqueles que se interessarem em saber sobre os resultados obtidos com o presente estudo serão orientados pela coordenadora geral do Projeto, Dra. Mayara Ingrid Sousa Lima (professora do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão), podendo ser contactada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular, no endereço: Av. dos Portugueses, 1966, cidade universitária do Campus do Bacanga, São Luís, Maranhão, telefone 32728543.

Os pacientes que não concordarem em participar da pesquisa não terão nenhum prejuízo sobre seu tratamento. Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor (a).

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com:

- Pesquisadora: Mayara Ingrid Sousa Lima. Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, Campus Universitário do Bacanga, São Luís, Maranhão. CEP: 65080-040; telefone (98) 3272-8543; e-mail: mayaingrid@yahoo.com.br

-Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal de Maranhão (CEP/UFMA): Av. dos Portugueses, 1966, Campus Universitário do Bacanga, Prédio CEB Velho, São Luís, Maranhão. CEP: 65080-805; telefone (98) 3272-8708; e-mail: cepufma@ufma.com.br.

São Luís, ____ de _____ de 20

Pesquisador Responsável

Voluntário

ANEXO - II**Laboratório de Genética e Biologia Molecular - LabGeM****Contato: (98) 3272 - 8543 (LabGeM) / (98) 98345-7722 (Profa. Dra. Mayara Lima) / (99)****991830832 (Gustavo de Almeida)****Ficha N° _____**

Obs: Para essa etapa do projeto será necessário coletar amostras de no mínimo 10 pacientes, sendo a primeira coleta antes do início do tratamento e a segunda coleta depois do tratamento no mesmo paciente.

Informações

Médico (a) responsável:

Docente responsável: Profa. Dra. Mayara Ingrid S. Lima

Discente responsável: Karina Cristina Silva Braga

Dados do paciente

Prontuário:

Nome: Data de Nascimento: ____/____/____

Sexo: () Masculino () Feminino Telefone: () _____ - _____

Endereço:.....Município:

Acompanhamento médico

- Unidade de Saúde:

- Médico responsável:

- Forma clínica: () LV () LT Cutânea () LT Difusa () LT Mucosa

- Coinfecção: () Não () HIV+ () outra Especificar:.....

- Quimioterapia: () Glucantime® () Anfotericina B () outro Especificar:.....

- Falha terapêutica: ()Sim ()Não -Recidiva Clínica: ()Sim ()Não

- Histórico de tratamento (informar a data e o tempo de tratamento de cada medicamento usado no paciente):

.....

.....

.....

- Sinais clínicos:

Sítios hemorrágicos: ()Sim ()Não

Presença de Edema: ()Sim ()Não

Icterícia: ()Sim ()Não

Vômito: ()Sim ()Não

Dispneia: Sim Não

Infecção Bacteriana: Sim Não

Outros sinais clínicos:

.....

- Exames laboratoriais:

Leucócitos:

Plaquetas:

Creatinina:

- Desfecho clínico

alta hospitalar por cura

óbito

transferência hospitalar

outros. Especificar:

-Coleta

- Coleta realizada antes ou depois do início do tratamento.

- A coleta foi realizada quantos dias depois do início do tratamento: (Somente para “depois do tratamento”)

Material biológico: sangue biopsia raspado dérmico medula

- Sinalizar os tubos de coleta: DNA RNA Soro Cultura

Coletado em: ____/____/____ Ass.:

Recebido em: ____/____/____ Ass.: