



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

JUAN JORGE MILLA ESPINO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ADENOSINA DEAMINASE EM
PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

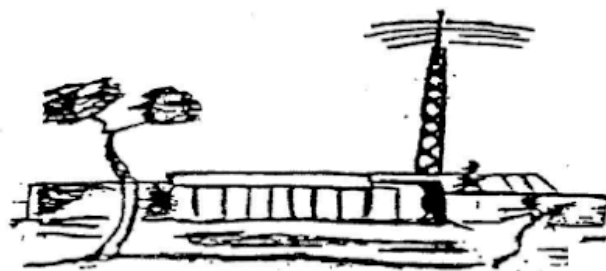
BRASÍLIA-DF

2024

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ADENOSINA DEAMINASE EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientadora: Dra. Elza Ferreira Noronha



BRASILIA-DF

2024

Universidade de Brasília (UnB)
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical
FICHA CATALOGRÁFICA

Ma Milla Espino, Juan Jorge
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ADENOSINA DEAMINASE EM
PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA / Juan Jorge Milla
Espino; orientador Elza Ferreira Noronha. -- Brasília,
2024.
87 p.

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) --
Universidade de Brasília, 2024.

1. leishmaniose cutânea. 2. biomarcadores. 3. adenosina
deaminase. 4. doenças negligenciadas. 5. quimioterapia . I.
Ferreira Noronha, Elza , orient. II. Título.

JUAN JORGE MILLA ESPINO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ADENOSINA DEAMINASE EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Aprovado em: 2 de fevereiro de 2024

Banca Examinadora

Presidente: Profa. Elza Ferreira Noronha

Membro externo: Prof. José Angelo Lauletta Lindoso

Membro interno: Prof. Gustavo Adolfo Sierra Romero

Membro suplente: Prof. Henry Maia Peixoto

Brasília-DF

2024

Dedicatória

Aos meus pais, Jorge Alberto Milla e Maria Teresa Espino, e meu irmão, Alejandro Milla, pelo apoio e amor constante e incondicional durante esta aventura no Brasil e durante a minha vida inteira.

A todos os pacientes com leishmaniose.

Agradecimentos

Este projeto não teria sido possível sem a ajuda direta e indireta de muitas pessoas.

A Profa. Elza Ferreira, pelo apoio, orientações e dicas desde o início até o final do meu primeiro projeto de pesquisa no Brasil.

A Profa. Márcia Hueb, pela enorme ajuda e apoio dentro e fora do hospital durante meus cinco meses em Cuiabá.

Os residentes de infectologia do Hospital Universitário Júlio Muller, pela ajuda, explicações, paciência, e boas conversas durante esses cinco meses.

O Oseias, Roney, e Livia, pela ajuda indispensável nas coletas e processamento das amostras.

O Wagner e Rayssa, pela ajuda na triagem e acompanhamento dos pacientes.

Os professores Rodrigo e Daiani pela ajuda na análise laboratorial das amostras, e o Vinicius por permitir o uso do seu equipamento para analisar as amostras.

Lista de abreviações, tabelas e figuras

Abreviações

PCR- Reação em cadeia da polimerase

GPI- glicosilfosfatidilinositol

iNOS2- óxido nítrico sintase 2

ADA- adenosina deaminase

SOD1- superóxido dismutase 1

Ágar NNN- Ágar Novy-McNeil-Nicolle

PNP- purina nucleosídeo fosforilase

XOD- xantina oxidase

POD- peroxidase

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

NADPH- nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADH- Dinucleótido de nicotinamida e adenina

TGO- Transaminase Glutâmico Oxalacética

TGP- Transaminase Glutâmico Pirúvica

IMC- Índice de Massa Corpórea

TCLE- termo de consentimento livre e esclarecido

ROC- Receiver Operating Characteristic

DATASUS- Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

SUS- Sistema Único de Saúde

Tabelas

Tabela 1. Variáveis clínicas e epidemiológicas do grupo de estudo e grupo controle

Tabela 2. Resultados dos exames diagnósticos do grupo de estudo

Tabela 3. Variáveis clínicas e epidemiológicas do grupo de estudo comparadas com o desfecho do tratamento

Tabela 4. Variáveis laboratoriais do grupo de estudo no D0 comparadas com o desfecho do tratamento

Tabela 5. Valores de sensibilidade e especificidade de adenosina deaminase como teste diagnóstico de leishmaniose cutânea no grupo de estudo segundo os diferentes pontos de corte da enzima com um IC de 95%

Tabela 6. Valores de sensibilidade e especificidade de adenosina deaminase como teste diagnóstico de falha terapêutica no D90 segundo os diferentes pontos de corte da enzima com um IC de 95%

Figuras

Figura 1. Conversão de adenosina em inosina pela enzima adenosina deaminase

Figura 2. Reações químicas envolvidas na utilização do Kit Adenosina Deaminase da Biotecnica.

Figura 3. Níveis da enzima adenosina deaminase do grupo controle e do grupo de estudo no D0, D30, D60 e D90.

Figura 4. Níveis enzimáticos no D0, D30, D60, D90 dos participantes que apresentaram falha terapêutica no final do período de acompanhamento, separados segundo a presença de melhora ou piora no tamanho das lesões

Figura 5. Curva ROC avaliando os níveis de ADA como teste diagnóstico de leishmaniose cutânea no grupo de estudo

Figura 6. Curva ROC avaliando os níveis de ADA como teste diagnóstico de falha terapêutica no D90 do estudo

Figura 7. Gráficas de dispersão dos níveis enzimáticos de ADA e a superfície total ulcerada dos pacientes do grupo de estudo nos dias 0, 30, 60 e 90.

Figura 8. Gráficas de dispersão dos níveis enzimáticos de ADA e a superfície total ulcerada dos pacientes do grupo de estudo com uma única lesão cutânea nos dias 0, 30, 60 e 90.

Órgãos Financiadores

O estudo se beneficiou do auxílio financeiro a discentes de pós-graduação para o desenvolvimento de dissertações e teses por meio do edital 04/2022 PROAP CAPES publicado pelo Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília para a compra de materiais.

Índice

Dedicatória.....	5
Agradecimentos	6
Lista de abreviações, tabelas e figuras.....	7
Órgãos Financiadores	10
Índice.....	11
Resumo e Abstract.....	13
Capítulo 1: Introdução	17
1.1 Situação epidemiológica	17
1.2 Resposta imunológica e fisiopatologia.....	18
1.3 Procedimentos diagnósticos	19
1.4 Tratamentos disponíveis	20
1.5 Biomarcadores	24
Capítulo 2: Justificativa.....	27
Capítulo 3: Objetivos.....	29
Objetivo Geral:.....	29
Objetivos Específicos:.....	29
Capítulo 4: Métodos.....	30
4.1 Tipo de estudo.....	30
4.2 População de estudo.....	30
4.3 Amostra do estudo	30
4.4 Critérios de inclusão e exclusão.....	31
4.5 Local de estudo.....	31
4.6 Delineamento do estudo e procedimentos realizados.....	32
4.6.1 Avaliação Clínica.....	32
4.6.2 Procedimentos Laboratoriais	33
4.7 Tipos de tratamento	40
4.8 Dados coletados	41
4.8.1 Clínicos e epidemiológicos.....	41
4.8.2 Laboratoriais.....	41
4.9 Critérios diagnósticos de leishmaniose.....	42
4.10 Desfechos do tratamento	42

4.11 Análise Estatística	43
4.12 Ética	44
Capítulo 5: Resultados	45
5.1 Resultados descritivos do grupo de estudo e grupo controle	45
5.2 Análise de variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais com o desfecho de tratamento.....	49
5.3 Níveis enzimáticos do grupo controle e grupo de estudo	52
5.4 Análise dos níveis de adenosina deaminase como teste diagnóstico de leishmaniose cutânea	54
5.5 Análise dos níveis de adenosina deaminase como teste diagnóstico de falha terapêutica	56
5.6 Análise de correlação entre os níveis enzimáticos e superfície ulcerada	58
Capítulo 6: Discussão	60
6.1 Características do grupo controle e do grupo de estudo	60
6.2 Comparação das características dos pacientes do grupo de estudo com o descrito na literatura.....	62
6.3 Análise de outras variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais com o desfecho do tratamento	63
6.4 Níveis de adenosina deaminase do grupo controle e do grupo de estudo.....	63
6.5 Adenosina deaminase como teste diagnóstico de leishmaniose cutânea	65
6.6 Adenosina deaminase como teste diagnóstico de falha terapêutica no D90 de acompanhamento.....	66
6.7 Correlação entre níveis enzimáticos e o tamanho das úlceras cutâneas	67
Capítulo 7: Conclusões.....	67
Capítulo 8: Referências Bibliográficas	69
Anexos	74
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Participante do Grupo de Estudo	74
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Participante do Grupo Controle	76
Ficha de Coleta de Dados	78
Bula do Kit Adenosina Deaminase	84

Resumo e Abstract

Resumo

Introdução: As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Um a 360 milhões de pessoas em 88 países estão em risco de desenvolver alguma das formas da doença. Em 2022 no Brasil foram notificados 13.044 casos novos de leishmaniose tegumentar americana. Os critérios de cura são clínicos, baseados na reepitelização completa das úlceras cutâneas. Existe uma necessidade de identificar marcadores biológicos com alta especificidade e sensibilidade que possam ser aferidos de forma pouco invasiva para auxiliar no acompanhamento do paciente e na avaliação da resposta terapêutica de uma forma objetiva. Um marcador promissor é a enzima adenosina deaminase, cuja utilidade tem sido demonstrada no diagnóstico de tuberculose e estudos tem relatado uma maior atividade enzimática em pacientes com leishmaniose visceral e leishmaniose dérmica pós-calazar.

Métodos: Foi realizado um estudo para avaliar a atividade da enzima adenosina deaminase em pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea. Foram incluídos 15 pacientes recém diagnosticados com leishmaniose cutânea e acompanhados mensalmente durante e depois do tratamento por um período de 90 dias. Em cada avaliação foi realizada uma avaliação clínica e foi realizada uma coleta de sangue venoso para posterior avaliação dos níveis enzimáticos. Paralelamente foram avaliados 10 participantes no grupo controle uma única vez. A quantificação enzimática foi realizada utilizando o Kit comercial Adenosina Deaminase da empresa Biotecnica.

Resultados: No grupo de estudo houve um predomínio do sexo masculino, estado conjugal casado, nível educacional fundamental ou menor, renda mensal inferior a 2 salários-mínimos, e a média de idade foi de 54,07 ±15,38 anos. O grupo controle apresentou um valor mediano de adenosina

deaminase de 6,29 (4,45) U/L. No grupo de estudo, o valor foi de 12,34 (9,06) U/L no D0, 12,26 (5,38) U/L no D30, 11,48 (5,45) U/L no D60 e 8,62 (4,13) U/L no D90. Foi encontrada uma diferença estatística significativa ($p=0,001$) entre os valores do grupo controle e do grupo de estudo do D0. Também foi encontrada uma diferença significativa entre os valores do grupo de estudo nos diferentes momentos do acompanhamento ($p=0,004$). A atividade enzimática foi avaliada como teste diagnóstico de leishmaniose cutânea utilizando um valor de 11,56 U/L como ponto de corte, sendo calculada uma especificidade de 100%, uma sensibilidade de 66,67%, e $p=0,001$. Também foi avaliada a atividade enzimática como teste diagnóstico de falha terapêutica utilizando um ponto de corte de 14,13 U/L, sendo calculada uma especificidade 100%, sensibilidade de 28,57% e $p=0,49$. Não foi encontrada correlação entre os níveis enzimáticos e a superfície total ulcerada.

Conclusão: Os resultados indicam uma maior atividade da enzima em pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea e uma diminuição gradual dos níveis enzimáticos ao longo do período de acompanhamento. As limitações do estudo foram um tamanho amostral reduzido, o uso de amostragem não probabilística e a não identificação da espécie de *Leishmania*. Estudos com amostras maiores e que incluam outras formas clínicas da doença são sugeridos.

Palavras-Chave: Leishmaniose Cutânea; Biomarcadores; Adenosina Deaminase; Doenças Negligenciadas; Quimioterapia

Abstract

Introduction: Leishmaniases are a group of infectious diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. About 360 million people in 88 countries are at risk of developing some form of the disease. In 2022, 13.044 new cases of American Tegumentary Leishmaniasis were reported in Brazil. Cure criteria are clinical, based on complete re-epithelialization of the ulcers. There is a need to identify biological markers with high specificity and sensitivity that can be measured non-invasively to assist in patient monitoring and the evaluation of the therapeutic response objectively. A promising marker is the enzyme adenosine deaminase, whose utility has been demonstrated in the diagnosis of tuberculosis. Studies have reported higher enzymatic activity in patients with visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis.

Methods: A study was conducted to assess the activity of the adenosine deaminase enzyme in patients diagnosed with cutaneous leishmaniasis. Fifteen patients newly diagnosed with cutaneous leishmaniasis were included and monitored monthly during and after treatment for a period of 90 days. At each assessment, a clinical evaluation was conducted, and venous blood was collected for subsequent evaluation of enzymatic levels. Concurrently, 10 participants were assessed in the control group only once. Enzymatic quantification was performed using the Adenosine Deaminase commercial kit from the Biotecnica company.

Results: In the study group, there was a predominance of males, married marital status, elementary education or lower, monthly income below 2 minimum wages, and the average age was 54,07 ±15,38 years. The control group showed a median value of adenosine deaminase of 6,29 (4,45) U/L. In the study group, the values were 12,34 (9,06) U/L at D0, 12,26 (5,38) U/L at D30, 11,48 (5,45) U/L at D60, and 8,62 (4,13) U/L at D90. A statistically significant difference ($p=0,001$) was found between the control group and the study group values at D0. A significant difference was also found between the study group values at different follow-up points ($p=0,004$). Enzymatic activity

was evaluated as a diagnostic test for cutaneous leishmaniasis using a cutoff value of 11,56 U/L, with a calculated specificity of 100%, sensitivity of 66,67%, and $p=0,001$. Enzymatic activity was also evaluated as a diagnostic test for therapeutic failure using a cutoff value of 14,13 U/L, with a calculated specificity of 100%, sensitivity of 28,57%, and $p=0,49$. Correlation between enzyme levels and total ulcerated surface was not observed.

Conclusions: The results show a higher enzymatic activity in patients diagnosed with cutaneous leishmaniasis and a gradual decrease of enzyme levels along the follow up period. Some limitations of the study included a small sample size, the use of non-probabilistic sampling, and the non-identification of the *Leishmania* species. Studies with a larger sample and that include other clinical forms of the disease are suggested.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis; Biomarkers; Adenosine Deaminase; Neglected Diseases; Drug Therapy

Capítulo 1: Introdução

1.1 Situação epidemiológica

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. No mundo são relatados aproximadamente dois milhões de casos novos e 70.000 óbitos anualmente ¹. Aproximadamente 360 milhões de pessoas em 88 países estão em risco de desenvolver alguma das formas da doença ². A leishmaniose tegumentar é a forma mais comum da doença e apresenta manifestações clínicas variáveis, incluindo as formas: cutânea localizada, cutânea difusa, disseminada e mucosa ³. A maioria dos casos de leishmaniose tegumentar no continente americano são causados por *Leishmania braziliensis* ⁴. No caso da leishmaniose cutânea, o 70% dos casos novos são relatados em: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Sudão e Síria ⁵. Historicamente a infecção esteve mais associada a trabalhadores agrícolas expostos ao vetor em ambientes rurais ⁶.

A doença é transmitida por insetos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. As diferentes espécies do vetor têm uma distribuição geográfica ampla e heterogênea. Vários animais silvestres e domésticos são considerados reservatórios, incluindo roedores, marsupiais, cães, felídeos e outros. Atualmente no Brasil, a leishmaniose tegumentar apresenta três padrões epidemiológicos. O padrão silvestre, que ocorre em áreas de densa vegetação e é considerada uma zoonose. O padrão ocupacional e de lazer, que está associado à exploração desordenada das florestas e ao desmatamento relacionado com a indústria agropecuária, construção, turismo e outras atividades. Finalmente, o padrão rural e periurbano, relacionado com as migrações de populações humanas para o interior do país e a construção de

centros urbanos em áreas associadas a matas ³. Mudanças ambientais relacionadas ao desmatamento e a construção de grandes projetos de infraestrutura estão envolvidos na disseminação da doença, e populações em situação de pobreza e condições de moradia inadequadas estão mais expostas ao vetor causando uma maior incidência da doença nesses grupos ⁵.

Em 2022 no Brasil foram notificados 13.044 casos novos de leishmaniose tegumentar americana. A doença acometeu principalmente ao sexo masculino, com 73,85% dos casos, e a faixa etária de 20-39 anos, com 38,43% dos casos. Os estados que notificaram mais casos foram: Pará com 2.927 (22,44%), Maranhão com 1.713 (13,13%), e Mato Grosso com 1.250 (9,58%) ⁷.

1.2 Resposta imunológica e fisiopatologia

O desenvolvimento da doença depende de uma interação complexa entre fatores relacionados com o parasito, o hospedeiro, o vetor, e o tipo de resposta imune do humano. Os protozoários se encontram na forma promastigota dentro do vetor flebotomíneo, e mudam para a forma amastigota no hospedeiro vertebrado, onde são fagocitados principalmente por macrófagos ⁸, mas outros tipos celulares como as células dendríticas, neutrófilos, e monócitos também podem ser infectados ⁹. Os parasitos conseguem sobreviver ao ambiente tóxico dentro dos macrófagos e multiplicam-se até a ruptura da célula, sendo liberados para infectar mais macrófagos. O controle da infecção é dependente da resposta imune celular, sendo o próprio macrófago a principal célula efetora, mas também a célula hospedeira. Os macrófagos são ativados pelos linfócitos T, por meio da secreção de IFN- γ ³.

Uma resposta imune celular T CD4⁺ Th1 é considerada essencial para o controle parasitário devido à secreção de IFN- γ e TNF- α que são responsáveis pela ativação dos macrófagos e células dendríticas ². Na ausência de resposta imune celular, acontece a forma disseminada da doença, já que os anticorpos secretados não neutralizam os parasitos. Por outro lado, uma resposta imune celular exacerbada está associada à forma mucosa da doença, onde existe uma carga parasitaria baixa, mas também dano tecidual ⁹. As lesões ulcerativas observadas na leishmaniose mucosa são consequência de uma resposta imune exacerbada, com altos níveis de IFN- γ , TNF, e atividade celular de macrófagos, células NK, e linfócitos. Nos casos de leishmaniose difusa, existe uma menor produção de IFN- γ , TNF, e maior produção de anticorpos e IL-5 ¹⁰.

A leishmaniose cutânea caracteriza-se pelo aparecimento de lesões no sítio da picada do vetor flebotomíneo, habitualmente acometendo áreas anatômicas expostas ao vetor tais como as extremidades e o rosto. As lesões iniciam como pápulas avermelhadas que evoluem em nódulos indolores e finalmente em úlceras com bordas bem definidas ¹¹. O aparecimento das lesões acontece depois de um período de incubação que geralmente dura 2-8 semanas ¹².

1.3 Procedimentos diagnósticos

A identificação do parasito nos tecidos é considerado o padrão ouro para o diagnóstico, mas apresenta menor sensibilidade em casos de baixa parasitemia ⁴ e sua acurácia é considerada inversamente proporcional ao tempo de evolução das lesões ³. Na realização da cultura, fragmentos obtidos da borda das lesões são inoculados no meio de cultivo Neal, Novy e Nicolle (NNN) e mantidos entre 24 C° e 26 C°. A cultura deve ser observada por até um mês antes de considerar o resultado como negativo ³. Alternativamente, o

material pode ser coletado diretamente das úlceras por punção com tubo selado a vácuo com meio de cultura ¹³. O teste intradérmico, ou intradermoreação de Montenegro, é baseado em uma resposta de hipersensibilidade celular retardada. Vários estudos relatam uma sensibilidade maior ao 90% ¹⁴ e tem a vantagem adicional de ser um teste barato e fácil de realizar ¹⁵. Nos casos de leishmaniose mucosa, a reação dérmica é exacerbada, e nos casos de leishmaniose cutânea difusa, o teste pode ser negativo. O teste pode permanecer positivo por vários anos após a cura clínica, e também pode acontecer uma reação cruzada com outras doenças ³. A técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR) é de grande utilidade devido a sua alta especificidade e sensibilidade, mesmo em casos de baixa parasitemia ¹⁶. A principal desvantagem da PCR é seu custo elevado e a necessidade de infraestrutura e pessoal especializado ³.

1.4 Tratamentos disponíveis

Atualmente, o tratamento de primeira linha da leishmaniose cutânea no continente americano são os antimoniais pentavalentes. Existem duas formulações, o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio. O antimoniato de meglumina é o único antimonial pentavalente comercializado no Brasil, com o nome de Glucantime ³. Acredita-se que a atividade antileishmania do medicamento depende de mecanismos diretos e indiretos. Os principais mecanismos diretos descritos são: a formação de complexos com ribonucleosídeos causando uma disfunção de topoisomerasas essenciais para a replicação do DNA e a transcrição, e a redução do fármaco dentro da amastigota para uma molécula com maior atividade. Os mecanismos indiretos estão envolvidos no regulamento da resposta imune, principalmente pelo aumento de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , o qual aumenta a atividade dos monócitos e neutrófilos ¹⁷.

Também tem sido proposto que a tripanotona redutase e os dedos de zinco proteicos possam ser alvos dos antimoniais pentavalentes ¹⁸.

O tratamento está associado com vários efeitos adversos, os mais importantes relacionados com a toxicidade sobre o sistema cardiovascular, que é dependente da dose e do tempo do tratamento e geralmente manifesta-se como inversão e achatamento da onda T e prolongação do intervalo QT ³. Outras possíveis complicações incluem pancreatite, pancitopenia, neuropatia periférica reversível, rigidez articular, sintomas gastrintestinais e nefrotoxicidade ¹⁸. Os antimoniais pentavalentes têm sido o tratamento de primeira linha por mais de 50 anos, mas estudos recentes feitos na América Latina relatam uma incidência de falha terapêutica de 7% a 39% ¹.

Existem tratamentos alternativos que são utilizados em casos de falha terapêutica ou quando o uso de antimoniais estiver contraindicado. Os fármacos utilizados são: anfotericina B, pentamidina e mais recentemente a miltefosina. Todos estes medicamentos tinham sido utilizados para o tratamento de outras doenças e foram reposicionados para o tratamento da leishmaniose. Esta é uma prática comum no tratamento das doenças tropicais negligenciadas ¹⁷.

A miltefosina, originalmente desenvolvida como agente antineoplásico, é um dos fármacos mais promissores atualmente. O fármaco é administrado pela via oral, e tem ação sobre a integridade da membrana fosfolipídea, a função mitocondrial do patógeno, e fomenta a resposta imune do tipo Th1 ¹⁹. O mecanismo de ação envolve alterações da síntese de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), do metabolismo éter-lipídeo, da coenzima A aciltransferase, dos sinais de transdução e o aumento na produção de óxido nítrico sintase 2 (iNOS2) ¹⁸. Um ensaio clínico reportou uma incidência de cura

de 69,23% no grupo de participantes tratados com miltefosina e pentoxifilina, comparado com uma incidência de 66,66% reportada no grupo tratado com antimoniais pentavalentes e pentoxifilina. A eficácia foi considerada equivalente, porém o primeiro grupo apresentou uma menor incidência de efeitos adversos ¹⁹. A principal limitação da miltefosina é seu efeito teratogênico, contraindicando e complicando o seu uso em mulheres grávidas e mulheres em idade fértil respectivamente ²⁰. Sintomas gastrointestinais leves são relatados com frequência ²¹ e tem sido descritos casos de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade ¹⁸. A miltefosina foi incorporada pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em 2018 ²².

A pentamidina é uma droga diamidina aromática que consiste em pentano-1,5-diol, que interfere na síntese da poliamina, na atividade da RNA polimerase, entra na célula do protozoário ligando-se ao RNA de transferência e impede a síntese de proteínas, ácidos nucleicos, fosfolipídios e folato ²³. Acredita-se que a entrada do fármaco são os transportadores de arginina e poliamina e que se acumula nas mitocôndrias ¹⁸. Algumas desvantagens da pentamidina são seu efeito diabético, que limita o seu uso na população com alterações no metabolismo da glicose, e que o paciente precisa estar bem alimentado antes da administração do fármaco para evitar hipoglicemia e lipotimia ²⁴.

A anfotericina B é um fármaco antifúngico isolado do *Streptomyces nodusus*, um fungo nativo da região do Rio Orinoco, na Venezuela. O fármaco liga-se ao ergosterol, componente importante da membrana celular do parasita, causando a formação de poros permitindo a saída de cátions, ânions e outras substâncias através da membrana causando a morte do parasita. O tratamento está associado a múltiplos efeitos adversos, incluindo náuseas, vômitos, diarreia, mialgia, artralgia, cefaleia, perda de peso, anorexia e taquipneia. A formulação lipossomal apresenta uma melhor biodisponibilidade

e propriedades farmacocinéticas, e menor incidência de efeitos adversos que a formulação de desoxicolato ¹⁸. A anfotericina B está associada a nefrotoxicidade e hematotoxicidade ²⁰.

Segundo o protocolo de tratamento da leishmaniose cutânea localizada causada por *Leishmania braziliensis* e outras espécies, exceto *Leishmania guyanensis*, a primeira escolha terapêutica é o antimoniato de meglumina intravenoso ou intramuscular. No caso de contraindicação por comorbidades, gestação, ou idade maior ou igual a 50 anos, utiliza-se a anfotericina B lipossomal. Alternativamente pode se utilizar o desoxicolato de anfotericina B ou o isetionato de pentamidina. Em pacientes com lesão única com diâmetro menor a 3 cms, outra opção disponível é o tratamento com antimoniato de meglumina intralesional ³.

O desfecho do tratamento depende de múltiplos fatores além do fármaco utilizado e da forma clínica da doença. Fatores relacionados com o hospedeiro tem um papel importante, já que uma resposta imune eficiente é requerida para apoiar o tratamento farmacológico ²⁵. Um exemplo são os pacientes com imunodeficiências como aqueles co-infetados com HIV, que apresentam pior resposta terapêutica, maior incidência de recidivas, e apresentações clínicas mais graves e atípicas. Esses eventos podem ser explicados pela desregulação imune causada pelo HIV, promovendo uma resposta de tipo Th2, que resulta ineficaz ²¹. Variações menores na resposta imune do hospedeiro podem influir na eficácia do fármaco, assim como também diferenças entre indivíduos podem causar variações farmacocinéticas dos tratamentos disponíveis. Fatores relacionados com o parasito também têm sido descritos, tais como a virulência da espécie de *Leishmania* envolvida e a infecção do parasita por vírus RNA ²⁵.

As lesões na leishmaniose cutânea localizada podem apresentar uma reepitelização mesmo sem tratamento farmacológico específico em até 70% dos pacientes. Nesses casos, apesar de apresentar cura clínica, o DNA parasitário pode persistir e no futuro pode ser causa de uma recidiva da doença ou do aparecimento de lesões mucosas ¹¹. Os critérios de cura são clínicos e está indicado o acompanhamento regular para verificar a resposta terapêutica e detectar uma possível recidiva. Na leishmaniose cutânea a cura é definida como a reepitelização completa de todas as lesões e o desaparecimento de crosta, descamação, infiltração e eritema. Segundo o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar do Ministério da Saúde, espera-se que a reepitelização aconteça em até 90 dias e que o desaparecimento da crosta, descamação, infiltração e eritema aconteça em até 180 dias ³. Embora esses sejam os critérios oficiais, alguns centros de saúde aplicam eles de forma mais rigorosa ou mais flexível segundo a experiência clínica deles.

1.5 Biomarcadores

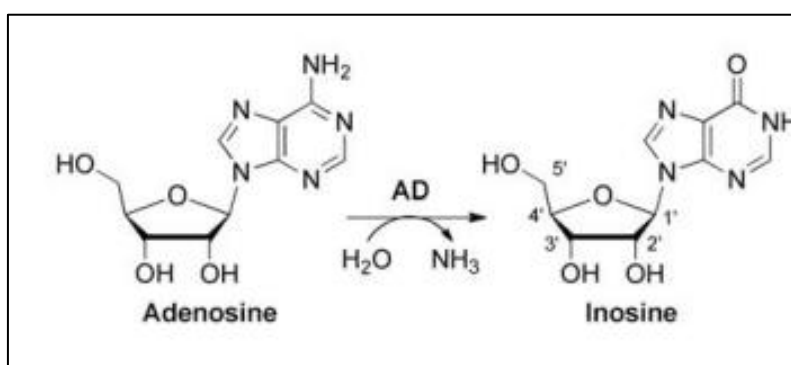
O problema com o uso de critérios clínicos para definir cura é que pode acontecer uma recidiva da doença depois de esse período, que é difícil de prever. Existe uma necessidade de identificar marcadores biológicos com alta especificidade, sensibilidade e que possam ser medidos de formas pouco invasivas para avaliar a resposta ao tratamento ao longo prazo de uma forma objetiva. Vários marcadores têm sido avaliados com esse propósito, apresentando diferentes vantagens e limitações ²⁶.

Um marcador promissor é a adenosina deaminase (ADA), que é uma enzima envolvida no catabolismo das purinas e associada à proliferação e diferenciação dos linfócitos. A atividade elevada da enzima é considerada um marcador de imunidade celular ²⁷, observada principalmente em infecções que

envolvem aos macrófagos ²⁸. A enzima catalisa a conversão de adenosina em inosina, liberando amônia no processo (Figura 1). Tem uma ampla distribuição nos tecidos dos vertebrados, com maior atividade nos tecidos linfóides. Nos mamíferos, duas formas moleculares da enzima são conhecidas ²⁹. ADA 1 é ubíqua, apresentando uma distribuição generalizada no organismo e ADA 2 encontra-se principalmente nos monócitos e macrófagos. Nos fluidos corporais, as duas isoformas são encontradas misturadas, e a identificação de cada uma das isoformas é considerado um procedimento complicado e pouco prático ³⁰. A quantificação de ADA total é um procedimento relativamente fácil de realizar, o que é uma característica importante para que o marcador seja de utilidade nas áreas onde a leishmaniose é endêmica ²⁸.

Na literatura é descrito um papel importante da enzima no diagnóstico de tuberculose. Acredita-se que a atividade enzimática nesses casos está relacionada com o número de linfócitos T ativados em resposta aos antígenos tuberculosos. Tem sido descrito o uso dos níveis de ADA séricos no diagnóstico de tuberculose pulmonar e em amostras não sanguíneas tais como líquido pleural, líquido ascítico e líquido cefalorraquidiano para casos de tuberculose não pulmonar ³¹. Atualmente a dosagem de ADA em líquido pleural faz parte da rotina diagnóstica em casos suspeitos de derrame pleural tuberculoso em vários países onde a tuberculose é endêmica, com alguns estudos relatando uma sensibilidade maior de 95% e apresentando a vantagem de ser um teste barato e rápido de realizar ³². Embora tenha sido demonstrada a utilidade da enzima no diagnóstico da tuberculose, ainda existem problemas associados ao uso dela. Não tem sido determinado um ponto de corte universal devido à grande variação dos resultados entre regiões, sendo necessária a regionalização do ponto de corte. Outra dificuldade está relacionada com o método utilizado para quantificar a enzima, que também não está padronizado ³³.

Um estudo realizado na Índia reportou níveis de ADA significativamente maiores em pacientes com leishmaniose visceral e leishmaniose dérmica pós-calazar em comparação com um grupo controle de participantes saudáveis, e os níveis diminuíram ao longo do tratamento ³⁴. Resultados semelhantes foram reportados em um estudo na Turquia, onde pacientes com leishmaniose cutânea apresentaram maiores níveis de ADA no soro e nos linfócitos que o grupo controle.



Fonte: Murkin A, Moynihan M. Transition-State-Guided Drug Design for Treatment of Parasitic Neglected Tropical Diseases. *Curr Med Chem*. 2014 Apr 5;21(15):1781–93.

Figura 1. Conversão de adenosina em inosina pela enzima adenosina deaminase

Outro biomarcador que tem sido avaliado como preditor da resposta terapêutica em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *Leishmania braziliensis* é a enzima superóxido dismutase 1 (SOD1). Esta enzima é produzida pelo parasita como mecanismo de defesa contra espécies reativas de oxigênio. Os níveis de SOD1 foram significativamente maiores em pacientes com a doença em comparação com o grupo controle de pessoas saudáveis, e também esteve associado com maior probabilidade de falha terapêutica em pacientes tratados com antimoniais pentavalentes ³⁵.

Níveis elevados da enzima arginase foram associados à presença de leishmaniose cutânea, e nos casos de infecção por *Leishmania major* e *Leishmania tropica* a associação foi inversamente proporcional ao tempo de evolução das lesões. Também tem sido estudada a produção de anticorpos contra antígenos encontrados na saliva dos insetos flebotomíneos como um marcador de exposição vetorial. A quantificação de citocinas também tem sido utilizada como marcador em algumas situações. IL-10 tem sido sugerida como marcador de falha terapêutica em casos de leishmaniose cutânea, e o nível de TNF- α nas biopsias de úlceras tem sido correlacionado com o tamanho das lesões ⁸.

Capítulo 2: Justificativa

Atualmente não existem marcadores biológicos para avaliar a resposta ao tratamento descritos para leishmaniose cutânea. Os critérios de cura são clínicos, sendo avaliada a reepitelização das lesões cutâneas, presença de crosta, infiltração, descamação e edema após um período de acompanhamento pós-tratamento. Uma limitação desses critérios é que o paciente pode apresentar os critérios de cura e apresentar uma recidiva da doença meses ou anos depois. Em contraste, para o acompanhamento de outras doenças se tem disponíveis testes de sorologia, carga viral e outros para a avaliação objetiva do desfecho do tratamento.

Existe uma necessidade de identificar marcadores biológicos que sejam pouco invasivos e que possam ser avaliados a um baixo custo para ajudar na avaliação da resposta terapêutica. Vários marcadores biológicos já têm sido estudados com esse propósito, com resultados mistos.

A enzima adenosina deaminase é um exemplo promissor já estudado em pacientes com leishmaniose visceral e leishmaniose dérmica pós-calazar na Índia, e também em pacientes com leishmaniose cutânea na Turquia. Os resultados desses estudos sugerem que os níveis enzimáticos podem ser utilizados como marcador diagnóstico e prognóstico em essas formas da doença.

O estudo pretendeu avaliar a atividade enzimática de adenosina deaminase em um grupo de pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea em uma área endêmica onde a maioria dos casos são causados por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

As hipóteses da pesquisa foram:

- H1: Os pacientes com leishmaniose cutânea apresentam maior atividade de adenosina deaminase que os indivíduos sem a doença
- H2: Os níveis enzimáticos de adenosina deaminase nos pacientes com leishmaniose diminuem ao longo do período de tratamento e acompanhamento
- H3: Pacientes com leishmaniose cutânea que apresentem persistência de atividade enzimática elevada de adenosina deaminase no final do período de acompanhamento tem uma maior chance de apresentar falha terapêutica que os pacientes com menor atividade enzimática.

Capítulo 3: Objetivos

Objetivo Geral:

- Avaliar a atividade da enzima adenosina deaminase em pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea

Objetivos Específicos:

- Descrever as características dos participantes do grupo de estudo e do grupo controle incluídos.
- Comparar a atividade da enzima adenosina deaminase dos participantes do grupo de estudo com os participantes do grupo controle.
- Avaliar os níveis enzimáticos de adenosina deaminase do grupo de estudo ao longo do período de acompanhamento.
- Avaliar os níveis enzimáticos de adenosina deaminase como teste diagnóstico de leishmaniose cutânea e como teste diagnóstico de falha terapêutica no grupo estudado.

Capítulo 4: Métodos

4.1 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo de coorte clínica que incluiu avaliações transversais no período de acompanhamento. Um grupo de pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea foi avaliado mensalmente e acompanhado por um período de 90 dias. Um grupo controle de indivíduos sem leishmaniose foi avaliado uma única vez.

4.2 População de estudo

Pessoas adultas com diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana, forma cutânea, atendidas no ambulatório de leishmaniose do Hospital Universitário Júlio Muller em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, entre março e junho 2023.

4.3 Amostra do estudo

Foi utilizada uma técnica de amostragem não probabilística, por conveniência, para a seleção de participantes para ambos os grupos. Inicialmente foi calculado um tamanho amostral de 30 participantes para o grupo de estudo considerando um nível de confiança de 95% e poder de 80%. Devido a dificuldades para incluir pacientes em cumprimento com os critérios de inclusão no local de estudo, foram incluídos 15 participantes no grupo de estudo a partir da população atendida no Hospital Universitário Júlio Muller e

10 participantes no grupo controle a partir da população de acompanhantes dos pacientes no momento das consultas e da população de funcionários do Hospital Universitário Julio Muller.

4.4 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão para o grupo de estudo foram: ser maior de 18 anos, ser diagnosticado com leishmaniose cutânea confirmado pela presença de critérios clínicos e pelo menos um critério laboratorial, e receber tratamento com algum dos medicamentos disponíveis. Foram excluídos pacientes com histórico de adoecimento por leishmaniose, mulheres grávidas, pacientes com HIV, pacientes recebendo tratamento imunossupressor, e pacientes que não aceitaram participar no estudo.

Os critérios de inclusão para o grupo controle foram: ser maior de 18 anos. Foram excluídos aqueles com antecedentes de infecção por qualquer espécie de leishmania, mulheres grávidas, pessoas recebendo tratamento imunossupressor, e pessoas que não aceitaram participar no estudo.

4.5 Local de estudo

O estudo foi realizado no ambulatório de leishmaniose do Hospital Universitário Júlio Müller em Cuiabá, Mato Grosso, que atua como referência estadual para o diagnóstico e tratamento das leishmanioses, recebendo pessoas de outros estados da região Centro Oeste e inclusive da região Norte. Os pacientes com leishmaniose são atendidos duas vezes por semana, sendo atendidos uns 30 pacientes semanalmente. No hospital foram

notificados 4 casos novos de leishmaniose visceral e 107 casos novos de leishmaniose tegumentar americana em 2022, sendo 81 da forma cutânea e 26 da forma mucosa. O hospital tem a infraestrutura necessária e pessoal qualificado para a realização de pesquisas clínicas, incluindo ensaios clínicos avaliando a eficácia de novos tratamentos para a leishmaniose.

4.6 Delineamento do estudo e procedimentos realizados

Os participantes foram incluídos após o aceite e a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Foi realizada a entrevista e o exame clínico para preenchimento da ficha de coleta de dados. A avaliação clínica e conduta terapêutica foi realizada de acordo com os protocolos assistenciais do serviço ou projetos de pesquisa em andamento. A inclusão foi realizada no D0 e o acompanhamento foi realizado no D30, D60 e D90 (com um período de janela de ± 5 dias) para avaliação da evolução clínica e resposta ao tratamento. Em cada dia de avaliação foi também coletada uma amostra de sangue venoso para posterior avaliação da atividade da enzima adenosina deaminase. A população controle foi avaliada apenas uma vez no D0, sendo realizada uma entrevista para preenchimento da ficha de coleta de dados e sendo coletada uma amostra de sangue venoso.

4.6.1 Avaliação Clínica

Foi realizada uma entrevista para coletar dados pessoais, demográficos e clínicos. Após a aferição dos sinais vitais, peso, e estatura, foi realizado o exame físico da(s) lesão(ões) registrado na ficha clínica.

Para a avaliação da(s) lesão(ões), foram aferidos os diâmetros transversais e longitudinais. A aferição do tamanho foi realizada tendo como referência as bordas internas, utilizando um único paquímetro de plástico padronizado graduado em milímetros. No caso de pacientes com múltiplas úlceras, a área de todas as úlceras foi somada. Foi determinada a área da úlcera utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Área} : \left[\frac{\text{Diâmetro transversal}}{2} \right] \left[\frac{\text{Diâmetro longitudinal}}{2} \right] \pi$$

4.6.2 Procedimentos Laboratoriais

Todo paciente com suspeita clínica de leishmaniose cutânea foi submetido à rotina diagnóstica do Hospital Universitário Júlio Muller. A rotina envolve a coleta de material biológico para realização de cultura, estudo anatomopatológico, pesquisa parasitológica direta e estudo molecular de reação em cadeia da polimerase.

Primeiramente, após a orientação do paciente e a realização de assepsia e anestesia local, foi coletado material com uma escova para PCR realizando um contorno de 360° na borda interna da lesão.

Depois foi realizado um aspirado com uma agulha 25x0,8mm. A agulha foi inserida no tecido sem aspirar, apenas circundando a borda da lesão, realizando a aspiração na retirada da agulha. A linfa coletada foi colocada em uma lâmina com cuidado de evitar contaminação e espalhada na lâmina com

a ponta da agulha. A linfa foi também colocada em um tubo de sangue de mamífero colocando apenas a ponta da agulha dentro do tubo.

Para a realização do raspado foi utilizada a ponta não cortante de um bisturi, raspando a borda interna da lesão três vezes consecutivas e desenhando um círculo em uma lâmina após cada raspagem.

Para a biopsia, foi utilizada uma caneta de “punch” de 4mm ou 6mm para a retirada do fragmento. A caneta de “punch” foi colocada em ângulo de 90° com a pele e girada até aprofundar 2/3 da altura da lâmina da cortante. Após a obtenção do fragmento, este foi retirado com cuidado com pinça e cortado em 4 pedaços. Um fragmento foi colocado em um tubo com sangue de mamífero para realização de cultura parasitológica. Outros dois fragmentos foram colocados em tubos eppendorf para realização de PCR, um tubo com formol e o outro seco. O quarto fragmento foi utilizado para a realização do “imprint”, que consiste em “imprimir” ou “adesivar” o fragmento em uma lâmina para a obtenção de linfa deste. Ao finalizar, esse mesmo fragmento foi colocado em um frasco para realização do estudo anatomopatológico.

Resumindo, a pesquisa parasitológica direta foi realizada utilizando material coletado por meio do aspirado, raspado e biopsia. Para o estudo anatomopatológico foi utilizado um dos fragmentos coletados na biopsia. Para o estudo molecular de PCR foi utilizado o material coletado com a escova e dois dos fragmentos biopsiados, um deles armazenado no tubo seco e o outro no tubo com formol. A cultura foi realizada utilizando material coletado no aspirado e um dos fragmentos biopsiados.

4.5.2.1 Cultura

As culturas foram realizadas utilizando o ágar Novy-McNeil-Nicolle (NNN) modificado seguindo a rotina padronizada do Hospital Universitário Júlio Muller. Os tubos foram observados a cada 72-96 horas, utilizando microscópio invertido, por um período de quatro semanas. As culturas foram descartadas depois deste tempo quando o resultado for negativo.

4.5.2.2 Pesquisa Parasitológica Direta e Estudo Anatomopatológico

A pesquisa parasitológica direta e o estudo anatomopatológico foram realizados seguindo as técnicas e colorações padronizadas do Hospital Universitário Júlio Muller. A pesquisa direta foi considerada positiva quando foram observadas amastigotas no material coletado. Os resultados do estudo anatomopatológico foram considerados positivos quando houver visualização direta de amastigotas nos tecidos avaliados; sugestivos quando for descrita uma resposta inflamatória compatível com infecção por leishmania, tal como uma reação granulomatosa; inespecíficos quando for descrita uma reação pouco compatível com leishmaniose; e negativas quando for descrito um achado patológico completamente diferente.

4.5.2.3 Métodos moleculares

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Leishmaniose do Hospital Universitário Júlio Muller utilizando a técnica in house. Para a extração e amplificação de material genético foram utilizados reagentes de um kit comercial da marca Thermofisher. O procedimento está baseado na

amplificação de um fragmento de 120bp da região conservada de mini círculos de kDNA. As sequências dos primers utilizados são 5' (C/G)(C/G)(G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' and 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3'.

Para o preparo do MIX e das amostras de *Leishmania spp.* foram utilizados: o PowerUP SYBR Green Master Mix, primers, e água livre de nuclease. As amostras foram descongeladas antes do procedimento e colocadas em microtubos de 1,5 ml adequadamente identificados. Foram adicionados 300µl do reagente G1TC e 5µl do reagente Proteinase K e colocados no termobloco a 65 C° e deixadas overnight.

No seguinte dia foram preparados novos microtubos de 1,5 ml conforme a quantidade de amostras a serem analisadas, em duplicata. Em esses tubos foram adicionados 250µl do reagente Binding e 10µl do reagente Beads, e 200µl de amostra que foi deixada overnight e colocados no termobloco a 65C° por 10 minutos com agitação a 1050 rpm. Os microtubos foram colocados na estante magnética por 3 minutos ou até as Beads estarem por completo na parede do ímã, e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 400µl da solução Wash Buffer e os tubos colocados de novo na estante magnética por 3 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Depois foram adicionados 900µl de etanol 80% preparado na hora e os tubos colocados de novo na estante magnética por 3 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 600µl de etanol 80% e os tubos colocados na estante magnética por 3 minutos, descartando o sobrenadante novamente. Os tubos foram deixados a secar com as tampas abertas. Depois foram adicionados 70µl da solução Elution e os tubos colocados no termobloco a 65 C° por 10 minutos e colocados de novo na estante magnética por 3 minutos. Foram coletados 70µl

de DNA extraído de cada tubo e transferidos para outros microtubos identificados.

A análise das amostras foi realizada com um termociclador em tempo real QuantStudio 3 e o software QuantStudio Design and Analysis Desktop Software v1.5.1 com controles positivos e negativos. A configuração da amplificação foi a seguinte: 1 ciclo de incubação a 42C° por 2 minutos, 1 ciclo de ativação a 95C° por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95C° por 15 segundos, hibridização a 60C° por 20 segundos, e extensão a 68C° por 30 segundos. O processo é finalizado com 1 ciclo de melt curve a 95C° por 15 segundos, sendo repetido a 60C° por 1 minuto, e de novo a 60C° por 15 segundos. A fluorência acima do ponto de corte indicará ou não a positividade das amostras.

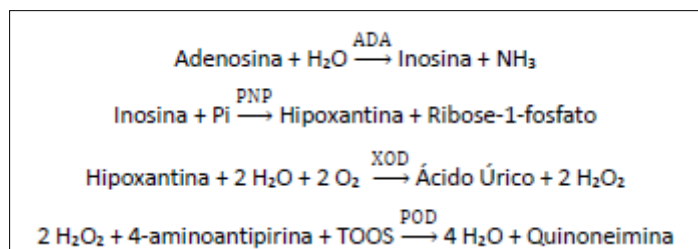
4.5.2.4 Avaliação dos níveis de adenosina deaminase

Durante o procedimento de inclusão e avaliação nos períodos D0, D30, D60 e D90 foram coletadas amostras de sangue por meio de punção venosa com agulha vácuo. As amostras foram coletadas em tubos vácuo de 4 ml de tampa vermelha com ativador de coágulo. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm para obter o soro, o qual foi congelado e armazenado no repositório do Hospital Universitário Julio Muller. O soro congelado a uma temperatura de -20C° tem um período de estabilidade de até 6 meses. As amostras foram transportadas por via área pela empresa Bio Transportes e recebidas no Hospital Universitário de Brasília, e foram analisadas no laboratório da Clínica Dr. Antônio Coelho em Brasília.

As amostras foram avaliadas pelos pesquisadores utilizando o Kit Adenosina Deaminase da empresa BioTécnica e um analisador clínico Wiener Lab CM200. O Kit contém os seguintes reagentes: **R1** (Tampão tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0; peroxidase 100 U/L; 4-aminoantipirina 4 mmol/L; PNP 300 U/L; XOD 400 U/L), **R2** (Tampão tris-HCl 25mmol/L pH 4,0; adenosina 11,0 mmol/L; TOOS 4,0 mmol/L; conservante), **Calibrador** (Tampão Hepes 50 mmol/L; adenosina deaminase 50 U/L. Rastreável ao material de referência BCR-647), **Controle 1** (Tampão Hepes 50 mmol/L; adenosina deaminase \cong 30 U/L) e **Controle 2** (Tampão Hepes 50 mmol/L; adenosina deaminase \cong 130 U/L). Os reagentes precisam ser armazenados a uma temperatura de entre 2C° e 8C°.

As amostras de soro e os reagentes foram aquecidos a 37C° por meio de banho de água termostático. Foi coletada uma amostra de soro de 5 μ l, foi adicionada uma quantidade de 180 μ l de R1 e incubada por 300 segundos. Depois foi adicionada uma quantidade de 90 μ l de R2 e incubada por 210 segundos. A solução resultante foi analisada no espectrofotômetro em 546 nm por 90 segundos.

O princípio do funcionamento do Kit é o seguinte: A adenosina deaminase (ADA) promove a desaminação enzimática da adenosina em inosina, a qual é convertida em hipoxantina pela purina nucleosídeo fosforilase (PNP). A xantina oxidase (XOD) catalisa a conversão da hipoxantina em ácido úrico e peróxido de hidrogênio, o qual reage com TOOS e 4-aminoantipirina, sob ação da peroxidase (POD), para gerar o corante quinoneimina. Este é espectrofotometricamente determinado em 546 nm. A intensidade da cor é proporcional à concentração de adenosina deaminase na amostra.



Fonte: Bula do kit comercial fornecida pelo fabricante

Figura 2. Reações químicas envolvidas na utilização do Kit Adenosina Deaminase da Biotecnica.

4.5.2.5 Avaliação de outros exames laboratoriais

Todos os outros exames laboratoriais foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Julio Muller. A análise laboratorial do hemograma foi realizada segundo a técnica laboratorial padronizada do laboratório. As amostras foram coletadas em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para evitar a coagulação das amostras e depois foram analisadas por meio de um sistema automatizado.

Os exames bioquímicos de glicose, função renal, e função hepática, também foram realizados segundo a técnica laboratorial padronizada do laboratório. As amostras sanguíneas foram coletadas em tubos sem anticoagulante e centrifugadas para obter plasma ou soro e serão analisadas por meio do método correspondente. A glicemia foi avaliada por meio de um método enzimático colorimétrico baseado na formação de NADPH cuja concentração foi medida por fotometria. A atividade de TGO e TGP foi avaliada por meio da taxa de oxidação de NADH, determinada por meio da medição da diminuição

da absorbância. Os níveis de bilirrubinas foram determinados por meio de um método colorimétrico. Os valores de creatinina foram determinados por meio de um ensaio colorimétrico baseado no método de Jaffé. Os níveis de proteínas séricas também foram determinados por meio de métodos colorimétricos e fotometria.

Para a avaliação de HIV, foi realizado o teste sorológico para HIV-1 e HIV-2 que faz parte da rotina do Hospital Universitário Júlio Muller. Para a realização do eletrocardiograma foi utilizada a técnica padrão, com o paciente em decúbito dorsal, os eletrodos correspondentes localizados nos pulsos, tornozelos e no peito nas posições V1-V6.

4.7 Tipos de tratamento

A rotina de tratamento esteve de acordo com os protocolos do serviço, sendo os seguintes protocolos os incluídos no estudo:

- **Glucantime:**
 - **Sistêmico:** Antimoniato de meglumina (1,5g/5ml) 10-20 mg/kg/dia por via intravenosa lenta, dose única diária por 20 dias.
 - **Intralesional:** Antimoniato de meglumina (1,5g/5ml) 1 ampola intralesional por cada lesão, a cada 15 dias, total de 3 doses

- **Miltefosina**
 - Miltefosina (50mg) 1 comprimido por via oral a cada 8 hrs por 28 dias

- **Pentamidina**
 - Isetionato de pentamidina (300mg) 4mg/kg/dia IV por 3-5 dias com intervalos de 48hrs
- **Anfotericina B**
 - Anfotericina B lipossomal liofilizada (50mg) 2-3mg/kg/dia até atingir dose total de 20-40mg/kg
- **Termoterapia + miltefosina**
 - Uma sessão de termoterapia no local da úlcera seguida de miltefosina (50mg) 1 comprimido por via oral a cada 8 hrs por 21 dias

4.8 Dados coletados

4.8.1 Clínicos e epidemiológicos

Sexo, idade, raça/cor, peso, altura, índice de massa corpórea (IMC), estado conjugal, profissão, nível educacional, renda mensal estimada (utilizando o valor de salário-mínimo de R\$1.212,00 vigente até dezembro 2022), número de lesões cutâneas, tempo desde o aparecimento das lesões cutâneas, área da lesão, presença de comorbidades, tratamento utilizado, presença de reações adversas, desfecho do tratamento.

4.8.2 Laboratoriais

- Hematologia: hemoglobina, leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, basófilos, monócitos, plaquetas

- Bioquímica: Transaminase oxalacética, transaminase pirúvica, Bilirrubina total e frações, Glicose, Creatinina, níveis de adenosina deaminase
- Imunologia: teste de HIV
- Eletrocardiograma
- Cultura, PCR, pesquisa parasitológica direta, estudo anatomopatológico.

4.9 Critérios diagnósticos de leishmaniose

Para o estudo, foi definido como caso de leishmaniose cutânea todo paciente que apresentasse os critérios clínicos e pelo menos um critério laboratorial.

- **Critérios clínicos:** úlceras em áreas expostas da pele, com forma arredondada ou ovalada, base eritematosa, infiltrada, consistência firme, bordas bem delimitadas e elevadas
- **Critérios laboratoriais:** cultura positiva, anatomopatológico sugestivo ou positivo, pesquisa direta positiva, PCR positiva

4.10 Desfechos do tratamento

- **Cura:** reepitelização completa de todas as lesões cutâneas, desaparecimento de crosta, descamação, infiltração, e edema após 90 dias de acompanhamento
- **Falha:** reepitelização incompleta da área ulcerada, persistência de crosta, descamação, infiltração ou edema, piora da(s) lesão(ões), surgimento de

lesão(ões) mucosa(s), surgimento de novas úlceras cutâneas, óbito, em até 90 dias de acompanhamento

Na rotina do ambulatório de leishmaniose do Hospital Universitário Julio Muller, todo paciente considerado como falha terapêutica no D90 de acompanhamento era considerado candidato para ser tratado novamente.

4.11 Análise Estatística

Foram utilizadas medidas de dispersão e tendência central tais como a média, mediana, desvio padrão e intervalo interquartil para descrever os dados do grupo de estudo e o grupo controle. Para a comparação das variáveis descritivas de ambos os grupos foi utilizado o Teste T de Student para as variáveis quantitativas e o Teste Exato de Fischer para as variáveis qualitativas.

Na comparação da atividade enzimática entre o grupo controle e o grupo de estudo no D0 foi utilizado o Teste T de Student. Na avaliação dos níveis enzimáticos do grupo de estudo ao longo do período de acompanhamento foi utilizado o Teste T de Student, ANOVA de efeitos múltiplos e ANOVA de medidas repetidas.

Para avaliar a atividade enzimática como teste diagnóstico de leishmaniose cutânea e como teste diagnóstico de falha terapêutica foram elaboradas curvas Receiver Operator Characteristic (ROC). Na elaboração das curvas foram calculados os valores de especificidade e sensibilidade segundo os diferentes pontos de corte da enzima. Baseado nos pontos de corte

selecionados, foram realizadas comparações da atividade enzimática acima ou abaixo do ponto selecionado com o desfecho de interesse por meio do Teste Exato de Fischer.

Para as avaliações de correlação entre os níveis enzimáticos e a área total ulcerada foram elaboradas gráficas de dispersão e foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson.

Todas as análises foram realizadas utilizando o software Microsoft Excel e o Graph Pad Prism versão 10.

4.12 Ética

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para avaliação, com o CAAE 66238622.7.0000.5558 e foi aprovado com o número de parecer 5.898.370. O estudo esteve em cumprimento dos aspectos éticos estabelecidos na Declaração de Helsinque e diretrizes internacionais e brasileiras para as pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos visando salvaguardar os direitos, segurança e bem-estar dos participantes.

Um dos participantes incluídos no grupo controle relatou ter diagnóstico de esquizofrenia. A exclusão do participante foi considerada por motivos éticos. O participante finalmente foi incluído no estudo já que relatou estar recebendo tratamento farmacológico e foi considerado competente para compreender e assinar o TCLE, entendendo os possíveis riscos associados à sua participação.

Capítulo 5: Resultados

5.1 Resultados descritivos do grupo de estudo e grupo controle

Foram incluídos 15 participantes no grupo de estudo e 10 no grupo controle. No grupo de estudo houve 10 participantes de raça/cor parda e 1 de raça/cor preta. No grupo controle houve 5 participantes de raça/cor parda e 3 de raça/cor preta. Em ambos os grupos nenhum participante se identificou com a raça/cor indígena ou amarela. Similarmente, nenhum participante de ambos os grupos relatou ter estado conjugal de separado.

A respeito das profissões dos participantes do grupo de estudo; 4 (26,67%) foram trabalhadores(as) rurais, 3 (20%) aposentados(as), 2 (13,33%) donas de casa, e as profissões de contador(a), pintor(a), eletricista, professor(a), técnico(a) em instalações industriais, serviços gerais foram cada uma representada por 1 (6,67%) participante. No grupo controle houve 5 (50%) estudantes, e as profissões de dona da casa, aposentado(a), administrador(a) de oficina, secretário(a) e farmacêutico(a) foram cada uma representada por 1 (10%) participante.

Em relação às comorbidades dos participantes do grupo de estudo; 9 (60%) relataram ter hipertensão arterial sistêmica, 3 (20%) diabetes mellitus, 1(6,67%) asma bronquial e 1 (6,67%) insuficiência renal crônica. No grupo controle um participante (10%) relatou ter talassemia e outro (10%) esquizofrenia.

Todos os participantes do grupo de estudo e da população controle relataram ser residentes do estado de Mato Grosso. No grupo de estudo 4 (26,6%) participantes eram residentes do município de Chapada dos Guimarães, 3 (20%) de Cuiabá, 2 (13,3%) de Várzea Grande, 1 (6,7%) de Santo Antônio, 1 (6,7%) de Nova Mutum, 1 (6,7%) de Nova Xavantina, 1 (6,7%) de Barra do Bugres, 1 (6,7%) de Diamantino e 1 (6,7%) de Rosario Oeste. Na população controle 5 (50%) participantes eram residentes de Cuiabá, 2 (20%) de Cáceres, 1 (10%) de Nova Mutum, 1 (10%) de Rondonópolis e 1 (10%) de Várzea Grande.

Na análise estatística foi encontrada uma diferença estatística significativa entre o grupo de estudo e o grupo controle nas variáveis de estado conjugal ($p=0,04$) e escolaridade ($p=0,007$). Na análise estatística por meio do Teste T de Student foi encontrada diferença estatística entre os grupos na variável de idade ($p=0,006$) (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis clínicas e epidemiológicas do grupo de estudo e grupo controle

		Grupo de estudo			Grupo controle			Valor de p
		n	%	$\bar{x} \pm DP^*$	n	%	$\bar{x} \pm DP$	
Sexo	M	11	73,33	-	5	50	-	0,4
	F	4	26,67	-	5	50	-	
Raça/Cor	Branca	4	26,67	-	2	20	-	>0,99
	Pretos e pardos	11	73,33	-	8	80	-	
Estado conjugal	Solteiro(a)	3	20	-	7	70	-	0,04
	Casado(a)	10	66,67	-	3	30	-	
	Divorciado(a)	1	6,67	-	0	0	-	
	Viúvo(a)	1	6,67	-	0	0	-	
Escolaridade	Até fundamental	8	53,33	-	0	0	-	0,007
	Médio ou superior	7	46,67	-	10	100	-	
Renda mensal estimada	≤2 salário-mínimo	8	53,33	-	3	30	-	0,41
	>2 salários-mínimos	7	46,67	-	7	70	-	
Domicílio	Rural	7	46,67	-	4	40	-	>0,99
	Urbano	8	53,33	-	6	60	-	
Comorbidades	Sim	9	60	-	2	20	-	0,09
	Não	6	40	-	8	80	-	
Idade (anos)	-	-	-	54,07 ±15,38	-	-	36,9 ±12,89	0,006
Peso (kg)	-	-	-	94 ±15,59	-	-	73,25 ±18,9	0,165
Altura (cms)	-	-	-	176 ±9,32	-	-	170,7 ±10,53	0,363
IMC	-	-	-	30,3 ±5,96	-	-	25,14 ±6,74	0,074

Fonte: Ficha de coleta de dados * Média ± desvio padrão

Os 15 participantes incluídos no grupo de estudo apresentaram critérios clínicos de leishmaniose cutânea e pelo menos um critério laboratorial positivo. Os resultados dos diferentes procedimentos diagnósticos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados dos exames diagnósticos do grupo de estudo

	Resultado	n	%
Cultura	Positiva	7	46,67
	Negativa	8	53,33
PCR	Positiva	14	93,33
	Negativa	1	6,67
Anatomopatológico	Positivo	2	13,33
	Sugestivo	7	46,67
	Inespecífico	4	26,67
	Negativo	0	0,00
Pesquisa parasitológica direta	Não reportado	2	13,33
	Positiva	7	46,67
	Negativa	8	53,33

Fonte: Ficha de coleta de dados

A média de tempo de evolução das lesões cutâneas nos participantes do grupo de estudo foi de 13,9 ($\pm 6,66$) semanas. A mediana da área ulcerada dos participantes foi de 4,08 (4,43) cm^2 . Na avaliação do D0 do estudo, 10 (66,6%) participantes apresentaram uma única lesão cutânea, 1 (6,6%) participante apresentou duas, 1 (6,6%) apresentou três, 1 (6,6%) apresentou quatro, e 2 (13,3%) apresentaram um total de cinco lesões.

Em relação ao tratamento, 5 (33,33%) participantes foram tratados com Antimoniato de Meglumina intralesional, 5 (33,33%) com Miltefosina, 3 (20%)

com Isetionato de Pentamidina, 1 (6,67%) com Antimoniato de Meglumina sistêmico, e 1 (6,67%) participante foi incluso em um protocolo experimental que consistia em uma sessão de termoterapia seguida de um regime de 21 dias de miltefosina.

Dos 15 pacientes incluídos no grupo de estudo, 5 (33,3%) relataram ter apresentado algum efeito adverso durante o tratamento. Dois pacientes tratados com miltefosina e um tratado com antimoniato de meglumina sistêmico relataram náuseas e vômitos, um paciente tratado com antimoniato de meglumina intralesional apresentou dor no local da infiltração, e outro paciente tratado com miltefosina relatou ter apresentado mal-estar geral. Em todos estes casos os sintomas relatados foram leves e não foi considerado necessário interromper ou modificar o tratamento.

Dos 15 participantes, 11 foram acompanhados até o D90. Desses 11, 4 (36,4%) cumpriram os critérios de cura clínica, e 7 (63,6%) foram considerados falha terapêutica. Três pacientes com falha terapêutica foram tratados com miltefosina, dois com antimoniato de meglumina intralesional e dois com pentamidina.

5.2 Análise de variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais com o desfecho de tratamento

Não houve diferença estatisticamente significativa ao avaliar as variáveis clínicas e epidemiológicas dos participantes do grupo de estudo com o desfecho do tratamento (Tabela 3).

Tabela 3. Variáveis clínicas e epidemiológicas do grupo de estudo comparadas com o desfecho do tratamento

	Desfecho do tratamento		p
	Cura	Falha	
Sexo			
M	2	6	0,49
F	2	1	
Média de Idade em anos	47,25 ±20,5	56,28 ±15,55	0,48
Domicílio			
Urbano	3	2	0,24
Rural	1	5	
Tempo de evolução em semanas	15 ±5,03	11,42 ±5,16	0,3
Area total ulcerada no D0 em cms²	2,97 (5,37)	5,81 (2,46)	0,92
Número de lesões			
1	4	3	0,53
2	0	1	
4	0	1	
5	0	2	
Raça/Cor			
Branca	1	2	>0,99
Preta e parda	3	5	
Renda mensal			
≤2 salários	3	3	0,54
>2 salários	1	4	
Escolaridade			
Até fundamental	1	3	>0,99
Médio ou superior	3	4	
Tratamento			
Glucantime Intralesional	0	2	0,81
Miltefosina	2	3	
Pentamidina	1	2	
Miltefosina+termoterapia	1	0	
Comorbidades			>0,99
Sim	2	4	
Não	2	3	
Níveis de ADA no D90	7,6 (3,36)	10,62 (4,59)	0,26

Fonte: Ficha de coleta de dados

±: média e desvio padrão, (): mediana e intervalo interquartil

Foram avaliadas as variáveis laboratoriais dos participantes do grupo de estudo no D0 e comparadas com o desfecho do tratamento (Tabela 4). Em nenhuma das avaliações foi encontrada uma significância estatística. Adicionalmente, todos os participantes incluídos no grupo de estudo apresentaram uma avaliação eletrocardiográfica sem abnormalidades no D0.

Tabela 4. Variáveis laboratoriais do grupo de estudo no D0 comparadas com o desfecho do tratamento

	Desfecho do tratamento		Valor p
	Cura	Falha	
Hemoglobina (g/dl)	14,47 ±1,29	13,8 ±1,87	0,46
Leucócitos (cel/mm3)	7.465 (1.365)	7.220 (1.165)	0,34
Neutrófilos (cel/mm3)	4.974 ±829,3	4.333,8 ±467,67	0,22
Linfócitos (cel/mm3)	2.241 ±425,96	2.294,4 ±655,66	0,86
Eosinófilos (cel/mm3)	222 ±215,12	256,8 ±141	0,78
Basófilos (cel/mm3)	25,5 ±51	15,6 ±33,29	0,74
Monócitos (cel/mm3)	583 ±284,7	468,8 ±79,56	0,49
Plaquetas (cel/mm3)	287.750 ±59.349	216.545 ±46.858	0,1
TGO (U/L)	18,25 ±5,31	27,81 ±16,96	0,12
TGP (U/L)	24 (17,5)	30 (31,5)	0,054
Bilirrubina Direta (mg/dl)	0,13 ±0,05	0,19 ±0,07	0,22
Bilirrubina Indireta (mg/dl)	0,2 ±0,1	0,29 ±0,11	0,25
Bilirrubina Total (mg/dl)	0,33 ±0,15	0,48 ±0,15	0,23
Albumina (g/dl)	4,75 ±0,35	4,36 ±0,37	0,3
Creatinina (mg/dl)	1,1 ±0,21	1,17 ±0,36	0,65

Fonte: Ficha de coleta de dados

±: média e desvio padrão

(): mediana e intervalo interquartil

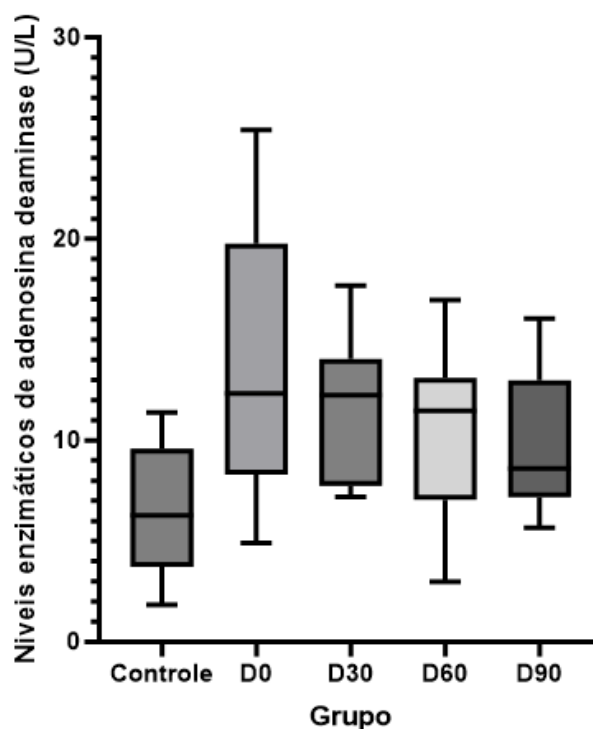
5.3 Níveis enzimáticos do grupo controle e grupo de estudo

O valor mediano de adenosina deaminase no grupo controle foi 6,29 (4,45) U/L. Os valores medianos no grupo de estudo foram: 12,34 (9,06) U/L no D0, 12,26 (5,38) U/L no D30, 11,48 (5,45) U/L no D60 e 8,62 (4,13) U/L no D90 (Figura 3).

Na avaliação estatística dos níveis enzimáticos do grupo controle com os níveis do grupo de estudo no D0 foi encontrada significância estatística ($p=0,001$) utilizando o Teste T de Student considerando um valor $\alpha=0,05$.

Não foi encontrada significância estatística ao avaliar os níveis enzimáticos do grupo de estudo no D0 com os níveis enzimáticos no D30 ($p=0,228$), D60 ($p=0,082$), e D90 ($p=0,062$) utilizando o teste T de Student com os mesmos parâmetros estatísticos mencionados, embora na Figura 3 tenha sido observada uma tendência a diminuir ao longo do período de acompanhamento.

Foi realizado um teste ANOVA de medidas repetidas para avaliar os níveis enzimáticos do grupo de estudo no D0, D30, D60 e D90 incluindo apenas os dados dos 11 participantes que completaram o acompanhamento de 90 dias. Foi calculado um valor $p=0,004$ e um valor $F=7,224$. Também foi realizado um teste ANOVA de efeitos mistos para avaliar os níveis enzimáticos do grupo de estudo no D0, D30, D60 e D90 incluindo todos os dados dos 15 participantes. Foi calculado um valor $p=0,0255$ e um valor $F=4,56$. Ambos os casos indicam uma diferença estatisticamente significativa entre os níveis enzimáticos no grupo de estudo ao longo do período de acompanhamento.

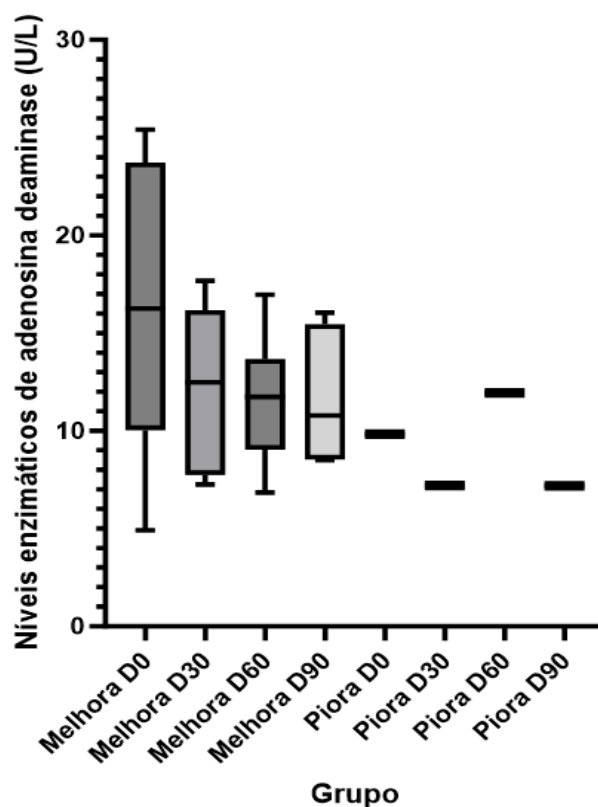


Fonte: Ficha de coleta de dados

Figura 3. Níveis da enzima adenosina deaminase do grupo controle e do grupo de estudo no D0, D30, D60 e D90.

Apesar de não ter atingido os critérios de cura definidos no estudo, dos 7 pacientes considerados como falha terapêutica, 6 apresentaram uma melhora clínica definida como uma diminuição na área total ulcerada durante o período de acompanhamento, e apenas 1 paciente apresentou uma piora clínica, definida como um aumento na área total ulcerada durante o período de acompanhamento. Os valores medianos da enzima desses 6 pacientes que apresentaram melhora clínica foram de 17,27 (9,84) U/L no D0, 12,49 (6,69) U/L no D30, 11,73 (2,23) U/L no D60 e 10,79 (5,13) U/L no D90. O valor da enzima do paciente que apresentou piora clínica foi de 9,82 U/L no D0, 7,2 U/L no D30, 11,94 U/L no D60 e 7,19 U/L no D90 (Figura 4).

Foi realizado um teste ANOVA de medidas repetidas para avaliar os níveis enzimáticos dos participantes que apresentaram uma melhora clínica nos dias 0, 30, 60 e 90. Foi calculado um valor $p=0,07$ e $F=4,65$.



Fonte: Ficha de coleta de dados

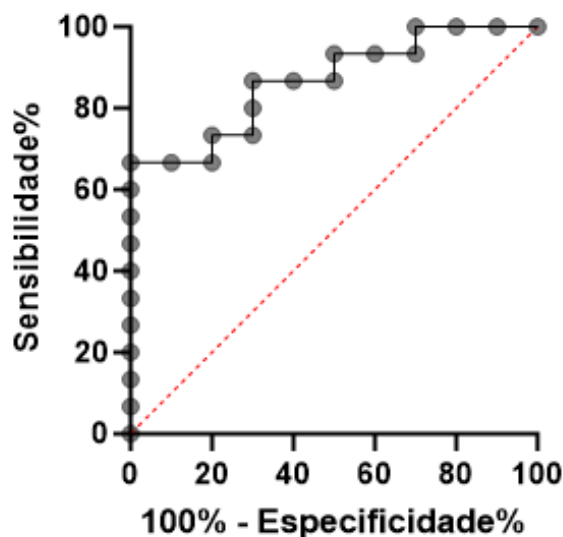
Figura 4. Níveis enzimáticos no D0, D30, D60, D90 dos participantes que apresentaram falha terapêutica no final do período de acompanhamento, separados segundo a presença de melhora ou piora no tamanho das lesões

5.4 Análise dos níveis de adenosina deaminase como teste diagnóstico de leishmaniose cutânea

Foi elaborada uma curva Receiver Operating Characteristic (ROC) para avaliar os níveis enzimáticos de adenosina deaminase como teste diagnóstico

de leishmaniose cutânea no grupo estudado (Figura 5), sendo calculado um valor sob a curva de 0,87. Para a realização da curva foram incluídos os níveis enzimáticos do grupo controle e do grupo de estudo no D0. Na elaboração da curva foram calculados os diferentes valores de sensibilidade e especificidade da enzima como teste diagnóstico segundo os diferentes pontos de corte da enzima (Tabela 5).

Considerando o valor de adenosina deaminase de 11,56 U/L (especificidade 100% e sensibilidade 66,67%) como ponto de corte, os dados foram organizados em uma tabela de contingência e foi realizado um Teste Exato de Fischer para comparar a atividade acima ou abaixo desse ponto com a presença ou ausência de diagnóstico de leishmaniose cutânea, sendo calculado um valor $p=0,001$. Foram calculados: um Valor Preditivo Positivo (VPP) de 1,0, um Valor Preditivo Negativo (VPN) de 0,67 e uma Razão de Chances (OR) de 40,09.



Fonte: Ficha de coleta de dados

Figura 5. Curva ROC avaliando os níveis de ADA como teste diagnóstico de leishmaniose cutânea no grupo de estudo

Tabela 5. Valores de sensibilidade e especificidade de adenosina deaminase como teste diagnóstico de leishmaniose cutânea no grupo de estudo segundo os diferentes pontos de corte da enzima com um IC de 95%

Nível de ADA (U/L)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
> 2.360	100 (79,61-100)	10 (0,51-40,42)
> 3.445	100 (79,61-100)	20 (3,55-50,98)
> 4.460	100 (79,61-100)	30 (10,78-60,32)
> 5.270	93,33 (70,18-99,66)	30 (10,78-60,32)
> 5.765	93,33 (70,18-99,66)	40 (16,82-68,73)
> 6.080	93,33 (70,18-99,66)	50 (23,66-76,34)
> 6.465	86,67 (62,12-97,63)	50 (23,66-76,34)
> 7.275	86,67 (62,12-97,63)	60 (31,27-83,18)
> 7.940	86,67 (62,12-97,63)	70 (39,68-89,22)
> 8.150	80 (54,81-92,95)	70 (39,68-89,22)
> 8.745	73,33 (48,05-89,10)	70 (39,68-89,22)
> 9.505	73,33 (48,05-89,10)	80 (49,02-96,45)
> 10.32	66,67 (41,71-84,82)	80 (49,02-96,45)
> 11.10	66,67 (41,71-84,82)	90 (49,02-96,45)
> 11.56	66,67 (41,71-84,82)	100 (72,25-100,0)
> 11.91	60 (35,75-80,18)	100 (72,25-100,0)
> 12.21	53,33 (30,12-75,19)	100 (72,25-100,0)
> 12.47	46,67 (24,81-69,88)	100 (72,25-100,0)
> 13.69	40 (19,82-64,25)	100 (72,25-100,0)
> 15.62	33,33 (15,18-58,29)	100 (72,25-100,0)
> 18.12	26,67 (10,90-51,95)	100 (72,25-100,0)
> 21.48	20 (7,04-45,19)	100 (72,25-100,0)
> 23.56	13,33 (2,36-37,88)	100 (72,25-100,0)
> 24.67	6,667 (0,34-29,82)	100 (72,25-100,0)

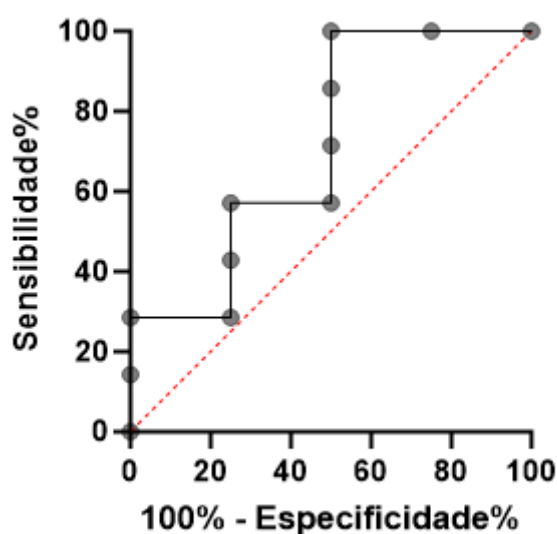
Fonte: Ficha de coleta de dados

5.5 Análise dos níveis de adenosina deaminase como teste diagnóstico de falha terapêutica

Foi elaborada uma curva ROC para avaliar os níveis enzimáticos de adenosina deaminase como teste diagnóstico de falha terapêutica no D90 do acompanhamento dos participantes incluídos no grupo de estudo (Figura 6),

sendo calculada uma área sob a curva de 0,71. Na elaboração da curva foram incluídos os níveis enzimáticos dos 11 participantes que foram acompanhados até o D90 separados segundo o desfecho de tratamento em cura ou falha terapêutica. Foram calculados os diferentes valores de sensibilidade e especificidade da enzima como teste diagnóstico de falha terapêutica segundo os diferentes pontos de corte da enzima (Tabela 6).

Considerando um valor de adenosina deaminase de 14,13 U/L (especificidade 100% e sensibilidade 28,57%) como ponto de corte, foi realizado um teste exato de Fischer para comparar a atividade acima ou abaixo desse ponto com o desfecho de cura ou falha terapêutica, sendo calculado um valor $p=0,49$. Foram calculados: um VPP de 1,0, um VPN de 0,44 e um OR de 4,09.



Fonte: Ficha de coleta de dados

Figura 6. Curva ROC avaliando os níveis de ADA como teste diagnóstico de falha terapêutica no D90 do estudo

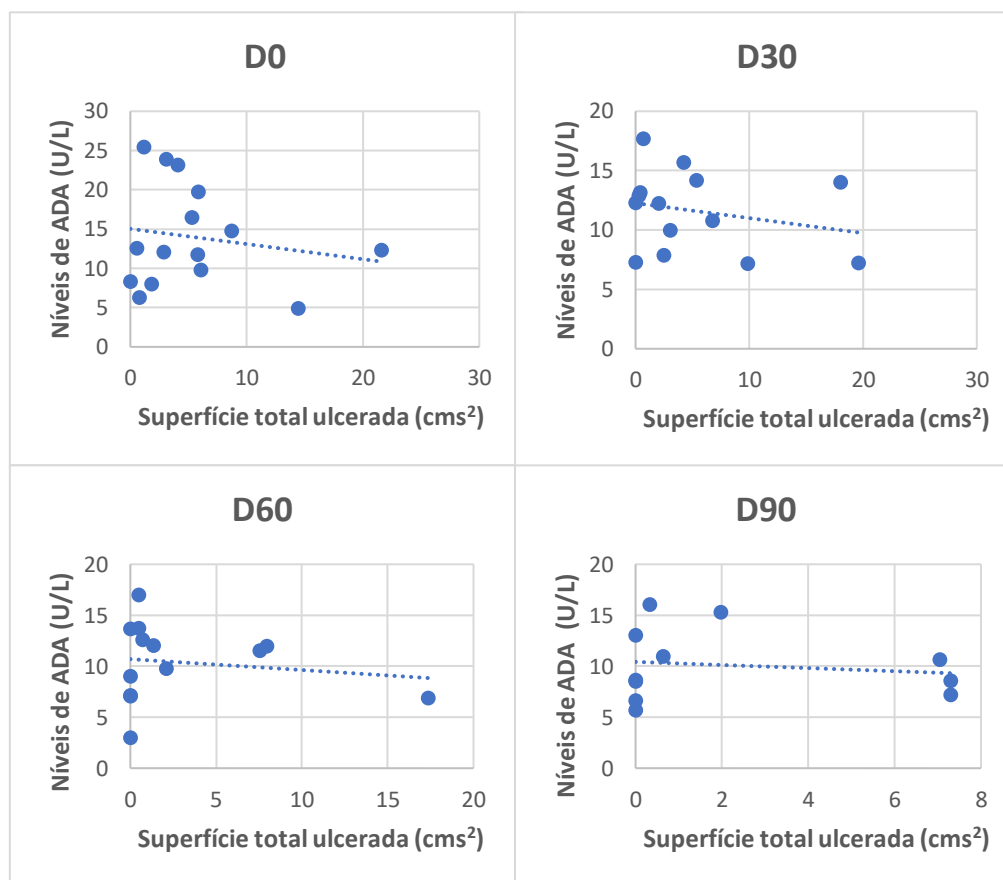
Tabela 6. Valores de sensibilidade e especificidade de adenosina deaminase como teste diagnóstico de falha terapêutica no D90 segundo os diferentes pontos de corte da enzima com um IC de 95%

Nível de ADA (U/L)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
> 6.125	100 (64,57-100)	25 (1,28-69,94)
> 6.885	100 (64,57-100)	50 (8,88-91,12)
> 7.845	85,71 (48,69-99,27)	50 (8,88-91,12)
> 8.520	71,43 (35,89-94,92)	50 (8,88-91,12)
> 8.580	57,14 (25,05-84,18)	50 (8,88-91,12)
> 9.620	57,14 (25,05-84,18)	75 (30,06-98,72)
> 10.79	42,86 (15,82-74,95)	75 (30,06-98,72)
> 11.98	28,57 (5,07-64,11)	75 (30,06-98,72)
> 14.13	28,57 (5,07-64,11)	100 (51,01-100,0)
> 15.65	14,29 (0,73-51,31)	100 (51,01-100,0)

Fonte: Ficha de coleta de dados

5.6 Análise de correlação entre os níveis enzimáticos e superfície ulcerada

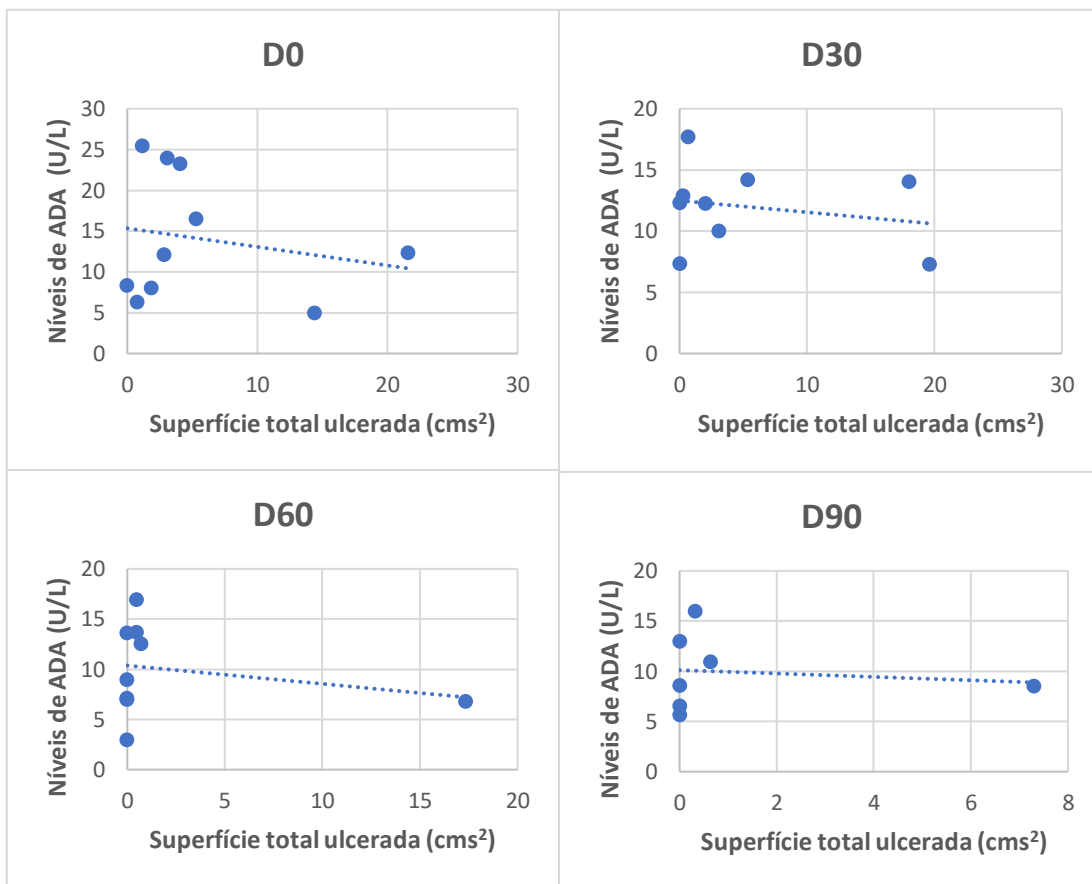
Foi realizada uma análise de correlação entre os níveis de adenosina deaminase e a superfície total ulcerada dos pacientes do grupo de estudo nos dias 0, 30, 60 e 90. Em nenhum dos casos foi encontrada uma correlação entre os dados, sendo calculado um coeficiente de correlação de Pearson de -0,17 no D0, -0,24 no D30, -0,15 no D60, e -0,14 no D90.



Fonte: Ficha de coleta de dados

Figura 7. Gráficas de dispersão dos níveis enzimáticos de ADA e a superfície total ulcerada dos pacientes do grupo de estudo nos dias 0, 30, 60 e 90.

Também foi realizada uma análise correlação entre os níveis enzimáticos de adenosina deaminase e a superfície total ulcerada do grupo de estudo nos dias 0, 30, 60 e 90 incluindo somente os participantes com uma única lesão cutânea. Novamente, em nenhum dos casos foi encontrada uma correlação, sendo calculado um coeficiente de correlação de Pearson de -0,20 no D0, -0,22 no D30, -0,23 no D60 e -0,12 no D90.



Fonte: Ficha de coleta de dados

Figura 8. Gráficas de dispersão dos níveis enzimáticos de ADA e a superfície total ulcerada dos pacientes do grupo de estudo com uma única lesão cutânea nos dias 0, 30, 60 e 90.

Capítulo 6: Discussão

6.1 Características do grupo controle e do grupo de estudo

No estudo houve algumas diferenças sociodemográficas entre o grupo de estudo e o grupo controle que vale a pena mencionar. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nas variáveis de

estado conjugal ($p=0,04$), escolaridade ($p=0,007$) e idade ($p=0,006$). Um 66,67% dos participantes do grupo de estudo relataram ser casados, porém no grupo controle 70% se identificaram com o estado conjugal de solteiro. Em relação à escolaridade, a maioria dos participantes do grupo de estudo relataram ter um nível fundamental ou menor, porém no grupo controle todos os participantes relataram ter um nível de escolaridade médio ou superior. Em relação à idade, a média foi de 54,07 anos no grupo de estudo e de 36,9 anos no grupo controle.

Na análise de outras variáveis não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, porém vale a pena mencionar algumas diferenças menores. A respeito do sexo dos participantes, no grupo de estudo houve um predomínio do sexo masculino (73,33%), enquanto no grupo controle a razão de sexos foi de 50%. Na variável de profissão, no grupo de estudo foi observada maior diversidade entre as respostas, mas a metade do grupo controle relatou ser estudante. Um 60% dos participantes do grupo de estudo relataram ter pelo menos uma comorbidade, comparado com apenas 20% dos participantes do grupo controle.

Estas diferenças entre os dois grupos podem ser explicadas pela forma em que os participantes do grupo controle foram convidados a participar no estudo. Os indivíduos convidados a fazer parte do grupo controle eram familiares ou cuidadores de pacientes e estavam acompanhando-os no momento da consulta no Hospital Universitário Júlio Muller ou eram empregados formais do hospital. Os acompanhantes ou cuidadores de pacientes são geralmente indivíduos mais jovens, o que explica que tenham menos comorbidades, sejam na sua maioria solteiros e estejam ainda em processo de formação acadêmica. Por motivos culturais também é comum que o cuidador seja do sexo feminino ³⁶, explicando a diferença da razão de sexos entre os grupos. No caso dos participantes que eram empregados do

hospital, esse fato reforça que sejam indivíduos jovens com maior nível de escolaridade. O fato de os participantes do grupo de estudo serem em média mais velhos que os participantes do grupo controle pode explicar a maior prevalência de comorbidades nesse grupo.

6.2 Comparação das características dos pacientes do grupo de estudo com o descrito na literatura

A grande maioria (73,33%) dos participantes do grupo de estudo foram do sexo masculino, o que concorda com o encontrado na literatura ^{3, 6, 37} e estatísticas recentes do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) para o Brasil e para o estado de Mato Grosso especificamente ⁷. Cerca de 53,33% dos participantes relataram ter um salário mensal menor ou igual a 2 salários-mínimos (aproximadamente <R\$2.024). Esse fato concorda com o encontrado na literatura, já que a leishmaniose é uma doença que geralmente acomete populações de baixa renda ^{6, 17}. No grupo de estudo, 53,33% dos participantes relataram ter um nível educacional fundamental ou menor, um dado que também concorda com a literatura ⁶.

Diferente do esperado, não foi observado um predomínio de residência em área rural, já que 53,33% dos participantes do grupo de estudo residiam em áreas urbanas. Esse achado pode ser explicado pelo fato de o Hospital Universitário Júlio Muller ser centro de referência estadual para casos de leishmaniose, recebendo pacientes de diversas áreas geográficas. Apenas 26,67% dos participantes no grupo de estudo eram trabalhadores rurais, um grupo historicamente considerado vulnerável para desenvolver a doença ³⁸. Isso pode ser explicado pela existência de mais de um padrão epidemiológico entre os participantes do grupo de estudo.

6.3 Análise de outras variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais com o desfecho do tratamento

Foi analisada uma possível relação entre várias variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais com o desfecho do tratamento, porém não foi encontrada significância estatística em nenhuma das avaliações. No estudo de Valencia et al, também não foi encontrada significância estatística ao comparar as variáveis de sexo, tempo de evolução da doença e número de lesões ao compará-las com o desfecho do tratamento. Porém, em aquele estudo foi encontrada significância estatística ao avaliar as variáveis de idade e área total ulcerada com o desfecho do tratamento ¹. As diferenças nos resultados podem ser explicadas pela diferença no tamanho das amostras e diferenças relacionadas com as espécies de *Leishmania* prevalentes na área de estudo e características genéticas da população estudada, considerando que o estudo foi realizado no Peru.

6.4 Níveis de adenosina deaminase do grupo controle e do grupo de estudo

Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$) entre os níveis enzimáticos do grupo controle e do grupo de participantes no D0. O resultado apoia uma das hipóteses da pesquisa, que os níveis enzimáticos de adenosina deaminase são maiores em pacientes com leishmaniose cutânea que na população sem a doença. Resultados semelhantes foram relatados por Erel et al, argumentando que o aumento na atividade enzimática poderia ser consequência da atividade fagocítica dos macrófagos, lembrando que um aumento nos níveis da enzima tem sido relatado em outras doenças infecciosas intracelulares que envolvem aos macrófagos ²⁸. Uma atividade enzimática significativamente maior também foi descrita por Vijayamahantesh et al ao comparar os níveis enzimáticos de pacientes com leishmaniose visceral e leishmaniose dérmica pós-calazar ativa com um grupo sem a

doença ³⁴ e por Rai et al ao comparar um grupo com leishmaniose visceral com um grupo controle ²⁷.

A respeito dos níveis de adenosina deaminase ao longo do período de acompanhamento, foi observada uma tendência a diminuir, porém não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa ao avaliar os dados por meio do teste T de Student. Porém, ao avaliar os dados por meio do teste ANOVA de medidas repetidas e ANOVA de efeitos mistos, foram calculados valores $p=0,004$ e $p=0,0255$ respectivamente. Uma diminuição da atividade enzimática pós-tratamento também foi descrita no estudo de Vijayamahantesh et al no grupo de pacientes com leishmaniose dérmica pós-calazar ³⁴. Esses últimos resultados apoiam outra das hipóteses da pesquisa, que os níveis de adenosina deaminase diminuem ao longo do período de tratamento e acompanhamento, sugerindo o uso dos níveis enzimáticos como um marcador do prognóstico da doença.

Foi realizada uma análise dos níveis enzimáticos dos 6 participantes que apresentaram falha terapêutica, já que 5 deles tinham apresentado uma melhora clínica embora não tenham cumprido os critérios de cura estabelecidos no estudo. Na avaliação dos níveis enzimáticos foi observada uma tendência a diminuir ao longo do período de acompanhamento, porém não foi encontrada uma diferença significativa ($p=0,07$). O único paciente que apresentou uma piora clínica teve uma atividade enzimática irregular, não podendo ser observada uma tendência a diminuir ou aumentar. Estes resultados também concordam com o relatado por Vijayamahantesh ³⁴. A ausência de significância estatística pode ter sido causada pelo número de pacientes reduzido.

Na interpretação destes resultados é importante considerar outros fatores que podem ter influenciado os níveis enzimáticos, tais como diferença significativa das médias de idade dos grupos e a inclusão de diferentes tratamentos farmacológicos no grupo de estudo, alguns com maior efeito imunomodulador.

6.5 Adenosina deaminase como teste diagnóstico de leishmaniose cutânea

O ponto de corte escolhido foi o valor de 11,56 U/L, representando uma especificidade de 100% e sensibilidade de 66,67%. Na literatura é mencionado que a escolha do ponto de corte nas avaliações de testes diagnósticos é subjetiva e depende do que o pesquisador pretende testar ³⁹. Neste caso, o valor foi escolhido ao considerar que para o paciente, um diagnóstico de leishmaniose cutânea representaria o início de um tratamento complicado, com alta toxicidade e alta incidência de efeitos adversos ^{3, 18} para tratar uma doença que não é letal. Alguns autores inclusive consideram que em algumas circunstâncias o tratamento pode ser pior que a mesma doença ¹⁷. Considerando esses fatores, foi selecionado o valor de 11,56 U/L para obter o maior nível possível de sensibilidade mantendo uma especificidade de 100%. Dessa forma, nenhum paciente sem leishmaniose seria falsamente diagnosticado e submetido a um tratamento tão arriscado. Porém, essa decisão também significa que um 33,33% de pacientes com leishmaniose não seriam diagnosticados por meio deste teste.

Ao avaliar se existe uma diferença significativa entre ter atividade enzimática acima ou abaixo de 11,56 U/L e ter ou não ter um diagnóstico de leishmaniose cutânea no grupo estudado, foi calculado um valor $p=0,001$. O resultado sugere que os níveis enzimáticos de ADA poderiam ter utilidade diagnóstica nos casos de leishmaniose cutânea. Estudos com amostras maiores são necessários para confirmar essa utilidade e verificar se

resultados semelhantes são encontrados nas outras formas clínicas de leishmaniose.

6.6 Adenosina deaminase como teste diagnóstico de falha terapêutica no D90 de acompanhamento

A intenção da avaliação foi investigar se os níveis elevados da enzima no D90 podiam estar associados a maior chance de apresentar falha terapêutica, um problema relativamente comum dos tratamentos atuais ¹. A escolha do ponto de corte seguiu os mesmos critérios utilizados anteriormente, procurando priorizar a especificidade sobre a sensibilidade. Foi selecionado um valor de 14,13 U/L como ponto de corte, com especificidade de 100% e sensibilidade de 28,57%.

Ao avaliar se existe uma diferença significativa entre ter atividade enzimática acima ou abaixo de 14,13 U/L e ter ou não ter falha terapêutica no D90 de acompanhamento, foi calculado um valor $p=0,49$. O resultado não permite rejeitar a hipótese nula, e não apoia o uso da atividade enzimática como teste diagnóstica de falha terapêutica no grupo estudado. Porém, uma limitação importante da análise é o tamanho limitado da amostra, já que apenas 11 participantes foram acompanhados até o D90, 4 deles apresentando cura e 7 falha terapêutica. Novamente, estudos com amostras de maior tamanho serão necessários para confirmar esses achados.

6.7 Correlação entre níveis enzimáticos e o tamanho das úlceras cutâneas

Foi analisada uma possível correlação entre os níveis enzimáticos e a área total ulcerada dos pacientes no grupo de estudo. Foi argumentado que maiores níveis de adenosina deaminase estariam correlacionados com uma maior superfície ulcerada. O motivo do argumento se baseava no fato da enzima ser considerado um marcador de imunidade celular ^{27,28}. Também está bem documentado na literatura que uma resposta celular muito robusta está associada a maior dano tecidual ⁹.

Na primeira avaliação foram incluídos todos os participantes do grupo de estudo, e não foi encontrada uma correlação entre os níveis enzimáticos e a superfície total ulcerada no D0, D30, D60 ou no D90. Na segunda avaliação foram incluídos apenas os participantes do grupo de estudo que apresentaram apenas uma única lesão cutânea. Foi considerado que os pacientes com múltiplas lesões podiam apresentar uma maior superfície ulcerada consequência do número de lesões e não necessariamente consequência de uma resposta celular mais robusta. Novamente não foi encontrada uma correlação entre os níveis enzimáticos e a superfície total ulcerada em nenhum dos dias avaliados.

Capítulo 7: Conclusões

Os participantes do grupo de estudo foram predominantemente do sexo masculino, com uma idade média de 54,07 anos e com nível educacional e renda mensal baixas. Dos 11 participantes que foram acompanhados até o

D90, 4 (36,4%) apresentaram os critérios de cura estabelecidos no estudo. Foi encontrada uma diferença significativa entre os níveis de adenosina deaminase do o grupo controle e do grupo de estudo do D0, e também no grupo de estudo ao avaliar os níveis enzimáticos ao longo do período de acompanhamento. No estudo foi observada uma possível utilidade dos níveis enzimáticos como teste diagnostico de leishmaniose cutânea, mas não como teste diagnostico de falha terapêutica no D90 de acompanhamento. Não foi encontrada uma correlação entre os níveis enzimáticos e a superfície total ulcerada.

As limitações do estudo foram um número limitado de participantes e a utilização de amostragem não probabilística por conveniência. Essas limitações dificultam a realização de inferências estatísticas da população com leishmaniose cutânea em geral, sendo válidas apenas para este grupo estudado. Outra limitação foi a não identificação da espécie de *Leishmania* responsável pelas infecções dos participantes, porém é possível assumir que *Leishmania (Viannia) braziliensis* tenha sido o agente causal mais comum. Para estudos futuros é sugerido trabalhar com uma amostra maior e incluir outras formas clínicas da doença.

Capítulo 8: Referências Bibliográficas

- ¹ Valencia C, Arévalo J, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Zimic M. Prediction Score for Antimony Treatment Failure in Patients with Ulcerative Leishmaniasis Lesions. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2012 Jun [cited 2021 Aug 28];6(6):e1656. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001656>
- ² Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011 Aug [cited 2022 May 12];9(8):604–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21747391/>
- ³ Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] Brasília, 2017
- ⁴ Dias D, Ribeiro P, Salles B, Santos T, Ramos F, Lage D, et al. Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. *Parasitol Int* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2021 Aug 28];67(3):344–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29408435/>
- ⁵ Saini I, Joshi J, Kaur S. Unwelcome prevalence of leishmaniasis with several other infectious diseases. *Int Immunopharmacol*. 2022 Sep 1;110:109059.
- ⁶ Passos V, Barreto S, Romanha A, Krettli A, Volpini A, Gontijo C, et al. Leishmaniose tegumentar na Região Metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos (1989-1995). *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2001 [cited 2021 Aug 28];34(1):5–12. Available from: <http://www.scielo.br/j/rsbmt/a/Bdnw4Vt7fTrnxSmyNXgBmh/?lang=pt>
- ⁷ Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/ltamt.def>
- ⁸ Bahrami F, Harandi AM, Rafati S. Biomarkers of Cutaneous Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2018 Jun 26 [cited 2021 Aug 28];8(JUN):222. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30429629/>
- ⁹ Scott P, Novais F. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2016 Aug 25 [cited 2022 May 12];16(9):581–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27424773/>
- ¹⁰ Lago T, Silva J, Lago E, Carvalho E, Zanette D, Castelucci L. The miRNA 361-3p, a Regulator of GZMB and TNF Is Associated With Therapeutic Failure and Longer Time Healing of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *L. (viannia) braziliensis*. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 28];9:2621. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30487794/>
- ¹¹ Volpedo G, Pacheco-Fernandez T, Holcomb EA, Cipriano N, Cox B, Satoskar AR. Mechanisms of Immunopathogenesis in Cutaneous Leishmaniasis And Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2021 Jun 8 [cited 2024 Jan 19];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34169006/>
- ¹² Scorza B, Carvalho E, Wilson M. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Jun 18 [cited 2024 Jan 19];18(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28629171/>

-
- ¹³ Romero G, Sampaio R, De Oliveira Macêdo V, Marsden P. Sensitivity of a Vacuum Aspiratory Culture Technique for Diagnosis of Localized Cutaneous Leishmaniasis in an Endemic Area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 1999 [cited 2024 Jan 19];94(4):505–8. Available from: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/k3hqLSpdTylPXPqGHpTsDVk/?lang=en>
- ¹⁴ Krolewiecki A, Almazan M, Quipildor M, Juarez M, Gil J, Espinosa M, et al. Reappraisal of Leishmanin Skin Test (LST) in the management of American Cutaneous Leishmaniasis: A retrospective analysis from a reference center in Argentina. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2017 Oct 5 [cited 2021 Sep 6];11(10):e0005980. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005980>
- ¹⁵ Braz L. Tegumentary leishmaniasis diagnosis: what happened with MST (Montenegro Skin Test) in Brazil? *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2019 Mar 11 [cited 2021 Sep 6];61. Available from: <http://www.scielo.br/j/rimts/a/XBj9MdkMXwf3zJN3Lm3yqHS/?lang=en>
- ¹⁶ Marques M, Volpini A, Machado-Coelho G, Machado-Pinto J, da Costa C, Mayrink W, Romanha A (2006). Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 54(1), 37–43. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2005.08.003
- ¹⁷ Carvalho S, Frézard F, Pereira N, Moura A, Ramos L, Carvalho G, et al. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. *Trop Med Int Heal* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2021 Sep 5];24(4):380–91. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tmi.13210>
- ¹⁸ Sasidharan S, Saudagar P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? *Parasitol Res* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2023 Nov 3];120(5):1541–54. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-021-07139-2>
- ¹⁹ Martins S, Barroso D, Rodrigues B, Motta J, Freire G, Pereira L, et al. A Pilot Randomized Clinical Trial: Oral Miltefosine and Pentavalent Antimonials Associated With Pentoxifylline for the Treatment of American Tegumentary Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2021 Sep 6];11. Available from: [/pmc/articles/PMC8281031/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/348281031/)
- ²⁰ Kapil S, Singh PK, Silakari O. An update on small molecule strategies targeting leishmaniasis. *Eur J Med Chem*. 2018 Sep 5;157:339–67.
- ²¹ Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, et al. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2008 Apr [cited 2023 Aug 9];21(2):334. Available from: [/pmc/articles/PMC2292576/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17222576/)
- ²² Ministério da Saúde. Nota Informativa nº 13/2020-CGVZ/DEIDT/SVS/MS — [Internet]. [cited 2023 Nov 6]. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/estudos-e-notas-informativas/2020/nota-informativa-miltefosina.pdf/view>
- ²³ Hafiz S, Kyriakopoulos C. Pentamidine. [Updated 2023 May 1]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557586/>
- ²⁴ Gadelha EPN, Ramasawmy R, da Costa Oliveira B, Morais Rocha N, de Oliveira Guerra JA, Allan Villa Rouco da Silva G, Gabrielle Ramos de Mesquita T, Chrusciak Talhari Cortez C, Chrusciak Talhari A. An open label randomized clinical trial comparing the safety and effectiveness of one, two or three weekly pentamidine isethionate doses (seven milligrams

per kilogram) in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the Amazon Region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Oct 31;12(10):e0006850. doi: 10.1371/journal.pntd.0006850. PMID: 30379814; PMCID: PMC6231690.

- ²⁵ Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin J-C, Barrett MP, Ló Pez-Vé Lez R, García-Hernández R, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. 2017 [cited 2023 Aug 9]; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>
- ²⁶ Kip A, Balasegaram M, Beijnen J, Schellens J, De Vries P, Dorlo T. Systematic review of biomarkers to monitor therapeutic response in leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2021 Aug 28];59(1):1–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25367913/>
- ²⁷ Rai A, Kumar P, Saini S, Thakur C, Seth T, et al. Increased level of soluble adenosine deaminase in bone marrow of visceral leishmaniasis patients: an inverse relation with parasite load. *Acta Parasitol* 2018 613 [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2021 Sep 1];61(3):645–9. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1515/ap-2016-0087>
- ²⁸ Erel O, Kocyigit A, Gurel MS, Bulut V, Seyrek A, Ozdemir Y. Adenosine Deaminase Activities in Sera, Lymphocytes and Granulocytes in Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 1998 [cited 2021 Aug 28];93(4):491–4. Available from: <http://www.scielo.br/j/mioc/a/8hdxNGZvDGj3HrcxK3nLy8H/?lang=en>
- ²⁹ Bakaryan A, Karapetyan L, Hakobyan N, Camaioni E, Mardanyan S, Antonyan A. Adenosine deaminase – A target for new piperazine derivatives. *Biophys Chem*. 2021 Oct 1;277:106658.
- ³⁰ Gakis C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *Eur Respir J* [Internet]. 1996 [cited 2024 Feb 3];9(4):632–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8726922/>
- ³¹ Ye Q, Yan W. Adenosine deaminase from the cerebrospinal fluid for the diagnosis of tuberculous meningitis: A meta-analysis. *Trop Med Int Heal* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2024 Feb 3];28(3):175–85. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tmi.13849>
- ³² Lee Y, Rogers J, Rodriguez R, Miller K, Light R. Adenosine Deaminase Levels in Nontuberculous Lymphocytic Pleural Effusions. *Chest*. 2001 Aug 1;120(2):356–61.
- ³³ Kaisemann MC, Kritski AL, Pereira M de FC, Trajman A. Dosagem da atividade da adenosina deaminase no líquido pleural para o diagnóstico da tuberculose pleural. *J Bras Pneumol* [Internet]. 2004 Dec [cited 2024 Feb 5];30(6):549–56. Available from: <https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/b9mStRhyj7v9dLXPZfswpC/>
- ³⁴ Vijayamahantesh, Amit A, Dikhit M, Pandey R, Singh K, Mishra R, et al. Elevated Serum ADA Activity as a Marker for Diagnosis and Prognosis of Visceral Leishmaniasis and Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis in Indian Patients. *PLoS One* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2021 Aug 28];11(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27186641/>
- ³⁵ Khouri R, Santos G, Soares G, Costa J, Barral A, Barral-Netto M, et al. SOD1 Plasma Level as a Biomarker for Therapeutic Failure in Cutaneous Leishmaniasis. *J Infect Dis* [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2021 Aug 28];210(2):306. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25367913/>

-
- ³⁶ Yamashita CH, Amendola F, Regina M, Alvarenga M, Amélia De Campos Oliveira M. Perfil sociodemográfico de cuidadores familiares de pacientes dependentes atendidos por uma unidade de saúde da família no município de São Paulo. *O Mundo da Saúde*, São Paulo: 2010;34(1):20-24
- ³⁷ Rocha T, Barbosa A, Santana E, Calheiros C. Aspectos epidemiológicos dos casos humanos confirmados de leishmaniose tegumentar americana no Estado de Alagoas, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* [Internet]. 2015 Dez [citado 2023 Nov 26]; 6(4): 49-54. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232015000400007&lng=pt.
- ³⁸ Santana G dos S. Estudo da associação de micronutrientes (zinco, cobre e ferro) na infecção, e ou progressão para leishmaniose tegumentar em duas comunidades rurais do Estado da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador BB. 2014 [cited 2023 Dec 5]; Available from: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/9044>
- ³⁹ Tustumi F. Choosing the most appropriate cut-point for continuous variables. *Rev Col Bras Cir* [Internet]. 2022 [cited 2023 Dec 14];49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35894391/>

Anexos

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Participante do Grupo de Estudo

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE- PARTICIPANTE

Convidamos o(a) Senhor(a) a participar voluntariamente do projeto de pesquisa “Adenosina Deaminase como marcador de falha terapêutica na leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*”, sob a responsabilidade do pesquisador Juan Jorge Milla Espino e Elza Ferreira Noronha.

O objetivo desta pesquisa é estudar se uma substância que está no sangue chamada adenosina deaminase pode ajudar a identificar como será a resposta ao tratamento da leishmaniose.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

A sua participação se dará por meio de resposta a perguntas sobre dados pessoais e antecedentes médicos, aferição do peso e altura, e avaliação das lesões na pele no dia 1 da participação com um tempo estimado de 30 mins. Também será coletada uma amostra de sangue para análise laboratorial obtida por meio de punção venosa que acontecerá nos dias 1, 30, 60 e 90 da participação, com tempo estimado de 5 minutos, a quantidade de sangue coletada será de 1 tubo de ensaio. Todos esses procedimentos serão realizados no serviço de leishmaniose do hospital Júlio Muller em Cuiabá, Mato Grosso. A participação no estudo não afetará de nenhuma forma a atenção e o tratamento, receberá portanto, os cuidados de acordo com a rotina do serviço.

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa relacionados aos procedimentos são: dor no local da punção e risco de infecção localizada no sítio da punção o qual será minimizado por meio de uma técnica adequada para a coleta da amostra e uma limpeza adequada do sítio de punção. Além desses existe o risco, embora mínimo, de vazamento de dados ou quebra da confidencialidade dos seus dados pessoais. Para evitar que isto aconteça serão tomados cuidados como a codificação da sua identificação na ficha de coleta de dados e na base de dados do estudo utilizando números e letras das iniciais do nome, não sendo utilizado o seu nome completo em nenhum momento. A base de dados também estará protegida por meio de senha garantindo segurança adicional. Se o(a) senhor(a) aceitar participar estará contribuindo para ajudar a esclarecer se a substância em estudo presente no sangue humano está relacionada com a maior chance de cura após a utilização do tratamento adequado da leishmaniose e ajudando no desenvolvimento de novos estudos sobre o tema para identificação de casos de leishmaniose que não vão

responder bem ao tratamento. Estas informações são importantes para a melhoria dos tratamentos e acompanhamento dos pacientes com leishmaniose.

O(a) Senhor(a) pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação na pesquisa, o(a) senhor(a) deverá buscar ser indenizado, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de cinco anos, após isso serão destruídos.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Juan Jorge Milla Espino, Elza Ferreira Noronha, na Universidade de Brasília no telefone (61) 998622711, disponível inclusive para ligação a cobrar, ou pelo email jmilla360@gmail.com.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina (CEP/FM) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidos pelo telefone (61) 3107-1918 ou do e-mail cepfm@unb.br, horário de atendimento de 08:30hs às 12:30hs e de 14:30hs às 16:00hs, de segunda a sexta-feira. O CEP/FM está localizado na Faculdade de Saúde/Faculdade de Medicina no 2º andar do prédio, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte.

Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o(a) Senhor(a).

Nome e assinatura do Participante

Nome e assinatura do
Pesquisador Responsável

Cuiabá, ____ de _____ de _____.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Participante do Grupo Controle

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE- CONTROLE

Convidamos o(a) Senhor(a) a participar voluntariamente do projeto de pesquisa “Adenosina Deaminase como marcador de falha terapêutica na leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Juan Jorge Milla Espino e Elza Ferreira Noronha.

O objetivo desta pesquisa é estudar se uma substância que está no sangue chamada adenosina deaminase pode ajudar a identificar como será a resposta ao tratamento da leishmaniose. O(a) senhor(a) está convidado a fazer parte do grupo controle, formado por pessoas que não têm esta doença. Sua participação pode ajudar a diferenciar o comportamento dessa substância em pessoas que têm a doença e em pessoas que não têm.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

A sua participação se dará por meio de resposta a perguntas sobre dados pessoais e antecedentes médicos, aferição do peso e altura, com um tempo estimado de 30 mins. Também será coletada uma amostra de sangue para análise laboratorial obtida por meio de punção venosa que acontecerá apenas uma vez, com tempo estimado de 5 minutos, a quantidade de sangue coletada será de 1 tubo de ensaio. Todos esses procedimentos serão realizados no serviço de leishmaniose do hospital Júlio Muller em Cuiabá, Mato Grosso.

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa relacionados aos procedimentos são: dor no local da punção e risco de infecção localizada no sítio da punção o qual será minimizado por meio de uma técnica adequada para a coleta da amostra e uma limpeza adequada do sítio de punção. Além desses existe o risco, embora mínimo, de vazamento de dados ou quebra da confidencialidade dos seus dados pessoais. Para evitar que isto aconteça serão tomados cuidados como a codificação da sua identificação na ficha de coleta de dados e na base de dados do estudo utilizando números e letras das iniciais do nome, não sendo utilizado o seu nome completo em nenhum momento. A base de dados também estará protegida por meio de senha garantindo segurança adicional. Se o(a) senhor(a) aceitar participar estará contribuindo para ajudar a esclarecer se a substância em estudo presente no sangue humano está relacionada com a maior chance de cura após a utilização do tratamento adequado da leishmaniose e ajudando no desenvolvimento de novos estudos sobre o tema para identificação de casos de leishmaniose que não vão responder bem ao tratamento. Estas informações são importantes para a melhoria dos tratamentos e acompanhamento dos pacientes com leishmaniose.

O(a) Senhor(a) pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de

participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação na pesquisa, o(a) senhor(a) deverá buscar ser indenizado, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de cinco anos, após isso serão destruídos.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Juan Jorge Milla Espino, Elza Ferreira Noronha, na Universidade de Brasília no telefone (61) 998622711, disponível inclusive para ligação a cobrar, ou pelo email jmilla360@gmail.com.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina (CEP/FM) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidos pelo telefone (61) 3107-1918 ou do e-mail cepfm@unb.br, horário de atendimento de 08:30hs às 12:30hs e de 14:30hs às 16:00hs, de segunda a sexta-feira. O CEP/FM está localizado na Faculdade de Saúde/Faculdade de Medicina no 2º andar do prédio, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte.

Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o(a) Senhor(a).

Nome e assinatura do Participante

Nome e assinatura do Pesquisador Responsável

Cuiabá, ____ de _____ de _____.

Ficha de Coleta de Dados



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina

TÍTULO: ADENOSINA DEAMINASE COMO MARCADOR DE FALHA TERAPÊUTICA NA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS*

Pesquisador responsável: Juan Jorge Milla Espino

FICHA DE COLETA DE DADOS

Participante Controle

No. de referência:

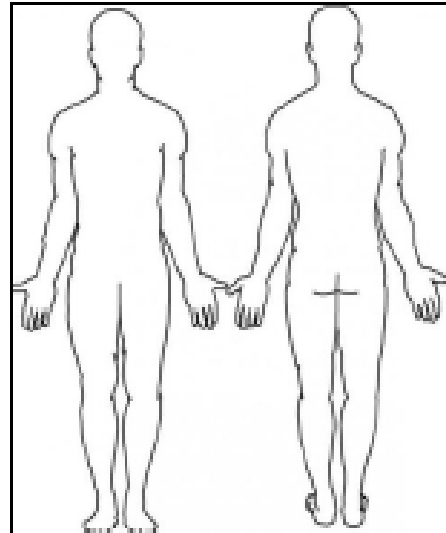
DADOS PESSOAIS	
Sexo	M () F ()
Idade	
Raça/Cor	() Branca () Parda () Preta () Indígena () Amarela
Estado conjugal	() Solteiro(a) () União Estável () Casado(a) () Separado(a) () Divorciado(a) () Viúvo(a)
Escolaridade	() Nenhuma () Educação infantil () Ensino fundamental () Ensino médio () Ensino superior
Renda mensal estimada	() <1 salário mínimo () 1-2 salários mínimos () 2-3 salários mínimos () 3-4 salários mínimos () 4-5 salários mínimos () >5 salários mínimos
Cidade e Estado	_____ () Urbano () Rural
Profissão	() Lavrador(a) () Faxineiro(a) () Comerciante () Estudante () Motorista () Professor(a) () Construção () Outra _____

DADOS DO TRATAMENTO	
Fármaco(s) utilizado(s)	() Glucantime sistêmico () Miltefosina oral () Outro
Dose utilizada	
Duração do tratamento (dias)	
Número de doses administradas	

CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS	
Crítérios clínicos	() Presentes () Ausentes
<ul style="list-style-type: none"> úlcera em áreas expostas da pele, com forma arredondada ou ovalada, base eritematosa, infiltrada, consistência firme, bordas bem delimitadas e elevada 	
Cultura	() Positiva () Negativa
<ul style="list-style-type: none"> <i>L. V. braziliensis</i> 	_____
PCR	() Positiva () Negativa
<ul style="list-style-type: none"> <i>L. V. braziliensis</i> 	_____

EXAME FÍSICO E DADOS LABORATORIAIS D0 [data de avaliação:]	
Peso (kg)	
Altura (cms)	
IMC	
Frequência cardíaca	
Frequência respiratória	
Pressão Arterial (mmHg)	
Número de lesões cutâneas	
Tempo desde o aparecimento das lesões	
Área total da(s) lesão(ões) em cms ²	
Comorbidades	() Não () Sim Quais?
Hemoglobina	
Leucócitos	
Neutrófilos	
Linfócitos	
Eosinófilos	
Basófilos	
Monócitos	
Plaquetas	
TGO	
TGP	
Bilirubina Direta	
Bilirubina Indireta	
Bilirubina Total	
Albumina	
Globulina	
Proteína Total	
Creatinina	
Teste HIV	() negativo () positivo
ADA	
EKG	

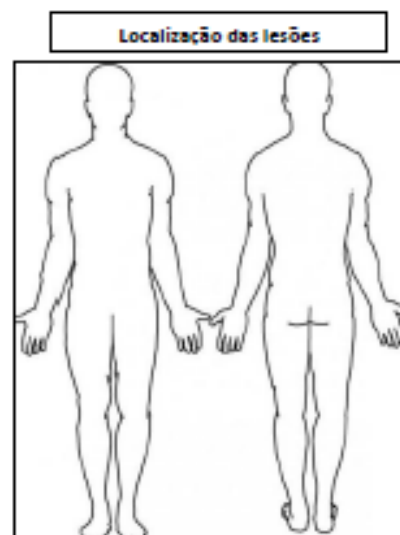
Localização das lesões



EXAME FÍSICO

OBSERVAÇÕES

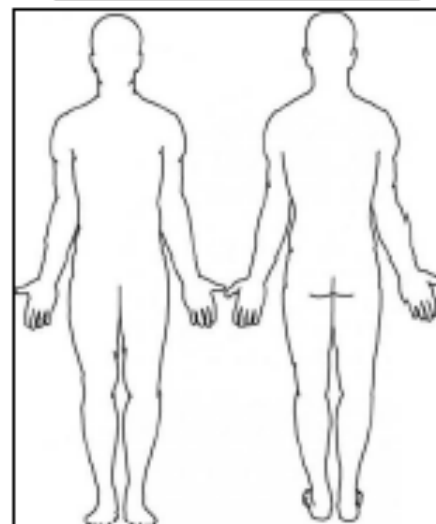
EXAME FÍSICO E DADOS LABORATORIAIS D30 [data de avaliação:]	
Peso (kgs)	
Altura (cms)	
IMC	
Frequência cardíaca	
Frequência respiratória	
Pressão Arterial	
Número de lesões	
Área total da(s) lesão(ões) em cms ²	
ADA	
Desfecho de tratamento	() Cura () Melhora () Falha
Reação adversa?	() Não () Sim Quais?



EXAME FÍSICO
<p style="text-align: center;"><u>OBSERVAÇÕES</u></p>

EXAME FÍSICO E DADOS LABORATORIAIS	
D60 [data de avaliação:]	
Peso (kgs)	
Altura (cms)	
IMC	
Frequência cardíaca	
Frequência respiratória	
Pressão Arterial	
Número de lesões	
Area total da(s) lesão(ões) em cms ²	
ADA	
Desfecho de tratamento	() Cura () Melhora () Falha
Reação adversa?	() Não () Sim Quais?

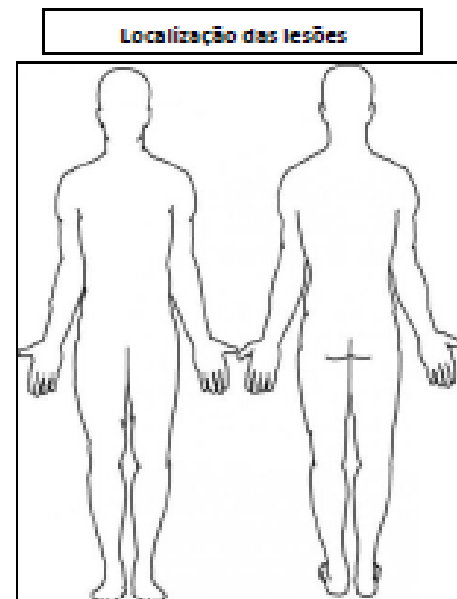
Localização das lesões



EXAME FÍSICO

OBSERVAÇÕES

EXAME FISICO E DADOS LABORATORIAIS D90 [data de avaliação: _____]	
Peso (kgs)	
Altura (cms)	
IMC	
Frequência cardíaca	
Frequência respiratória	
Pressão Arterial	
Número de lesões	
Area total da(s) lesão(ões) em cms ²	
ADA	
Desfecho do tratamento	<input type="checkbox"/> Cura <input type="checkbox"/> Melhora <input type="checkbox"/> Falha
Reação adversa?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Quais?



EXAME FISICO

OBSERVAÇÕES

Bula do Kit Adenosina Deaminase



Adenosina Deaminase - ADA

Adenosina Deaminase / Adenosina Deaminase
Ref. 11.063.00

Responsável Técnico
Dr. Gilson Sérgio Pizzo
CRF MG - 5310
MS 80027310299

FINALIDADE

Kit destinado à determinação de adenosina deaminase (ADA) em amostras de soro, plasma, líquido pleural e líquido cefalorraquidiano (líquor). Uso em diagnóstico in vitro.

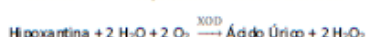
CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO, MANUSEIO E PREPARO DO PRODUTO

- Conservar de 2 a 8 °C, permanecendo fora da temperatura especificada somente o tempo necessário para a realização dos testes. Manter ao abrigo da luz.
- Reagentes prontos para uso.
- É recomendável realizar a calibração do produto a cada duas semanas.
- Após aberto, o produto em uso é estável até a validade impressa no rótulo, desde que seguras as condições de armazenamento recomendadas (2 a 8 °C).
- Não usar reagentes cuja data de validade tenha expirado.

PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

Método: Enzimático - Peroxidase

A adenosina deaminase (ADA) promove a desaminação enzimática da adenosina em inosina, a qual é convertida em hipoxantina pela purina nucleosídeo fosforilase (PNP). A xantina oxidase (XOD) catalisa a conversão da hipoxantina em ácido úrico e peróxido de hidrogênio, o qual reage com TOOS e 4-aminoantipirina, sob ação da peroxidase (POD), para gerar o corante quinoneimina. Este é espectrofotometricamente determinado em 546 nm. A intensidade da cor é proporcional à concentração de adenosina deaminase na amostra.



AMOSTRAS: TIPO, COLETA, MANUSEIO E PRESERVAÇÃO

Tipo de Amostra: soro, plasma (EDTA ou heparina), líquido pleural e líquido cefalorraquidiano (líquor).

Coleta e Manuseio: realizar a coleta da amostra conforme as Boas Práticas de Laboratório Clínico. Todas as amostras devem ser tratadas como material biológico potencialmente infectante.

Preservação:

	Temperatura	Período de Estabilidade
Soro e Plasma	2 a 8 °C	2 semanas
	-20 °C	6 meses
Líquido Cefalorraquidiano (líquor)	2 a 8 °C	1 semana
	-20 °C	1 mês
Líquido Pleural	-20 °C	6 dias

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

R 1 Tampão tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0; peroxidase 100 U/L; 4-aminoantipirina 4 mmol/L; PNP 300 U/L; XOD 400 U/L

R 2 Tampão tris-HCl 25mmol/L pH 4,0; adenosina 11,0 mmol/L; TOOS 4,0 mmol/L; conservante.

CAL Tampão Hepes 50 mmol/L; adenosina deaminase 50 U/L. Rastreável ao material de referência BCR-647.

CONTROL 1 Tampão Hepes 50 mmol/L; adenosina deaminase \approx 30 U/L

CONTROL 2 Tampão Hepes 50 mmol/L; adenosina deaminase \approx 130 U/L

CONTROLE DE QUALIDADE

O uso de controles deve ser prática rotineira do laboratório. Para Calibração e Controle Interno de Qualidade Laboratorial, recomenda-se o uso de:

Calibrador - ADA CAL
Controle Nível 1 - ADA CONTROL 1
Controle Nível 2 - ADA CONTROL 2

REF XX.XXX.XX
XX.XXX.XX
XX.XXX.XX

MATERIAL NECESSÁRIO PARA REALIZAÇÃO DO ENSAIO

- Espectrofotômetro ou fotômetro para leitura em 546 nm.
- Banho de água termostático a 37 °C e tubos de ensaio.
- Pipetas de vidro e/ou automáticas, relógio ou cronômetro.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO, CÁLCULOS E INTERPRETAÇÃO

A) PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Este procedimento pode ser aplicado na maioria dos analisadores automatizados. Os protocolos estão disponíveis em www.biotecnica.ind.br.

Tipo de reação	Cinética / Crescente
Comprimento de onda	546 nm
Temperatura	37 °C
Volume de amostra*	5 µL
Volume de R1*	180 µL
Incubação R1 + Amostra	300 segundos
Volume de R2*	90 µL
Incubação R1 + Amostra + R2	210 segundos
Medir a absorbância continuamente por	90 segundos
Calibração	2 pontos

*Os volumes podem ser modificados desde que mantida a proporção estabelecida.

B) CÁLCULOS

O equipamento calcula automaticamente a concentração do analito em cada amostra.

C) INTERPRETAÇÃO

A adenosina deaminase (ADA) é amplamente distribuída em vários tecidos do corpo humano, sendo encontrada principalmente em linfócitos T. Atividade aumentada da adenosina deaminase sérica é observada na hepatite aguda, fibrose hepática alcoólica, hepatite crônica ativa, cirrose, hepatite viral e pode ser observada no exsudato da tuberculose. Combinado com ALT ou γ -GT, a detecção da atividade da adenosina deaminase sérica em pacientes é de grande valor para o diagnóstico de doença hepática e a sua determinação em outras amostras de fluido corporal pode ajudar a diferenciar o diagnóstico de tuberculose.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Intervalo Operacional
3,0 a 200,0 U/L

Para valores acima do intervalo operacional, diluir a amostra com NaCl 150 mmol/L (0,9%), realizar nova dosagem e multiplicar o resultado do obtido pelo fator de diluição.

Sensibilidade	
Limite de Detecção	Limite de Quantificação
0,88 U/L	1,17 U/L

Especificidade Analítica		
Ácido Ascórbico	Hemoglobina	Triglicérides
50 mg/dL	800 mg/dL	1000 mg/dL

Concentrações de substâncias interferentes até os valores apresentados acima não causam alterações significativas nos resultados. Para medicamentos, consultar a referência bibliográfica recomendada (Young, 2000).

Exatidão	
Número de Amostras	40 amostras
Equação de Regressão	$y = 1,0224x + 0,0066$
Coefficiente de Correlação (R)	0,9994

A acurácia do produto foi avaliada com o material de referência BCR-647, no nível de decisão de 30,6 U/L, sendo o erro sistemático total de 1,53%.

Precisão:

Os estudos de precisão *intra-ensaio* foram realizados com 20 repetições em uma corrida analítica; os de precisão *inter-ensaio* foram realizados com 5 repetições por 5 dias.

Amostras (U/L)	Precisão Intra-ensaio		Precisão Inter-ensaio	
	SD (U/L)	CV (%)	SD (U/L)	CV (%)
30,0	0,170	0,59	0,030	1,70
140,0	0,286	0,20	0,110	0,51

CV: Coeficiente de variação; SD: Desvio padrão

RISCOS RESIDUAIS, CUIDADOS E PRECAUÇÕES

- Utilizar os EPIs e realizar os procedimentos de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Clínico.
- Seguir os requisitos preconizados nas Boas Práticas de Laboratório Clínico para a água utilizada no laboratório.
- Não misturar reagentes de lotes diferentes ou trocar as tampas dos frascos, a fim de evitar contaminação cruzada. Não usar o reagente quando ele apresentar característica visual em desacordo com o especificado na FISPQ do produto.
- Evite deixar os reagentes fora das condições de armazenamento especificadas.
- O nível de água do banho-maria deve ser superior ao dos tubos de ensaio que contém as reações.

INTERVALO DE REFERÊNCIA

Soro e Plasma	0 - 15 U/L
Líquido Pleural	0 - 30 U/L
Líquido cefalorraquidiano (líquor)	0 - 9 U/L

É recomendado que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de referência para refletir a idade, sexo, dieta e localização geográfica da população.

ALERTAS E PRECAUÇÕES COM RELAÇÃO AO DESCARTE DO PRODUTO

- As informações de Descarte, Segurança e Primeiros Socorros estão descritas na Ficha Individual de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) deste produto, disponível em www.biotecnica.ind.br ou pelo telefone +55 35 3214-4646.
- Descartar os resíduos das reações de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Clínico e Programa de Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde (PGRSS).

GARANTIA DE QUALIDADE / SAC - SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Os produtos Biotécnica são produzidos conforme as diretrizes das Boas Práticas de Fabricação e demais regulamentações sanitárias vigentes. Seu desempenho é assegurado desde que seguidas as instruções da Biotécnica. Em caso de dúvida na utilização do produto, entre em contato com a Assessoria Científica Biotécnica através do telefone +55 35 3214.4646 ou pelo email sac@biotecnica.com.br

ENGLISH**INTENDED USE**

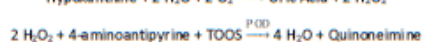
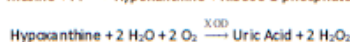
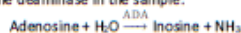
It is intended to determine adenosine deaminase (ADA) in serum, plasma, pleuroperitoneal fluid and cerebrospinal fluid samples. Diagnostic use only.

STORAGE AND HANDLING

- Store at 2 to 8 °C and protect from light. The product must remain out of the specified temperature only the time required for testing.
- Reagents ready for use.
- It is recommended to calibrate the product every two weeks.
- Once opened, the product is stable until the expiration date printed on the label, as long as the recommended storage conditions (2 to 8 °C) are followed.
- Do not use reagents whose shelf life has expired.

WORKING PRINCIPLE**Method: Enzymatic – Peroxidase**

Adenosine deaminase (ADA) promotes the enzymatic deamination of adenosine to inosine, which is converted to hypoxanthine by purine nucleoside phosphorylase (PNP). Xanthine oxidase (XOD) catalyzes the conversion of hypoxanthine to uric acid and hydrogen peroxide, which reacts with TOOS and 4-aminoantipyrine in the presence of peroxidase (POD) to generate the quinoneimine dye. The last one is spectrophotometrically measured at 546 nm. Color intensity is proportional to the concentration of adenosine deaminase in the sample.

**SAMPLE: TYPE, COLLECTION, HANDLING AND STABILITY**

Sample Type: serum, plasma (EDTA or heparin), pleuroperitoneal fluid and cerebrospinal fluid.

Collection and Handling: collect the sample in accordance with the Good Laboratory Practices. All samples should be treated as potentially infectious material.

Preservation:

	Temperature	Stability Period
Serum and Plasma	2 to 8 °C	2 weeks
	-20 °C	6 months
Cerebrospinal Fluid	2 to 8 °C	1 week
	-20 °C	1 month
Pleuroperitoneal Fluid	-20 °C	6 days

PRODUCT DESCRIPTION

R 1	Tris-HCl buffer 25 mmol/L pH 8,0; peroxidase 100 U/L; 4-aminoantipyrine 4 mmol/L; PNP 300 U/L; XOD 400 U/L	X
R 2	Tris-HCl buffer 25mmol/L pH 4,0; adenosine 11,0 mmol/L; TOOS 4,0 mmol/L; preservative.	X
CAL	Hepes buffer 50 mmol/L; adenosine deaminase 50 U/L. Traceable to reference material BCR-647.	
CONTROL 1	Hepes buffer 50 mmol/L; adenosine deaminase \cong 30 U/L	
CONTROL 2	Hepes buffer 50 mmol/L; adenosine deaminase \cong 130 U/L	

QUALITY CONTROL

The use of controls should be a routine practice in the laboratory. For the internal laboratorial quality control, it is recommended the use of the control below:

Calibrator – ADA CAL	XX.XXX.XX
Level 1 Control – ADA CONTROL1	XX.XXX.XX
Level 2 Control – ADA CONTROL2	XX.XXX.XX

NECESSARY EQUIPMENT FOR TESTING

- Spectrophotometer or photometer for reading at 546 nm.
- Thermostatic water bath at 37 °C and test tubes.
- Glass pipettes and/or automatic, clock or chronometer.

TEST PROCEDURE, CALCULATION AND INTERPRETATION**A) TEST PROCEDURE**

This product is compatible to most types of automatic analyzers. Instrument settings are available at www.biotecnica.com.br

Reaction Type	Kinetic / Positive
Wavelength	546 nm
Temperature	37 °C
Sample volume*	5 µL
R1 Volume*	180 µL
Sample + R1 Incubation Time	300 seconds
R2 Volume*	90 µL
R1 + Sample + R2 Incubation Time	210 seconds
Measure the absorbance continuously for 90 seconds	
Calibration	2 points

* Volumes can be modified as long as the established proportion is maintained.

B) CALCULATIONS

The equipment automatically calculates the analyte's concentration in each sample.

C) INTERPRETATION

Adenosine deaminase (ADA) is widely distributed in several tissues of the human body, being found mainly in T lymphocytes. Increased activity of serum adenosine deaminase is observed in acute hepatitis, alcoholic liver fibrosis, chronic active hepatitis, cirrhosis, viral hepatitis and it can be observed in tuberculosis exudate. Combined with ALT or γ -GT. The detection of serum adenosine deaminase activity in patients is valuable for the diagnosis of hepatic disease and its determination in body fluid samples can help to differentiate the diagnosis of tuberculosis.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Operating range
3.0 a 200.0 U/L

For concentrations above the operating range, dilute the sample with NaCl 150 mM (0.9%), proceed with a new dosage and multiply the result by the dilution factor.

Sensitivity	
Detection Limit	Quantification Limit
0.88 U/L	1.17 U/L

Analytical Specificity		
Ascorbic Acid	Hemoglobin	Triglycerides
50 mg/dL	800 mg/dL	1000 mg/dL

Interfering substances up to the values presented above do not cause significant alterations in results. For drugs, consult the recommended reference (Young, 2000).

Accuracy	
Number of Samples	40 samples
Regression Equation	$y = 1.0224x + 0.0066$
Correlation Coefficient (R)	0.9994

The product's accuracy was evaluated with the reference material BCR-647, at the decision level of 30,6 U/L, with a total systematic error of 1,53%.

Precision:

Within-run precision was determined with 20 replicates in an analytical run; between-run precision was determined with 5 replicates for 5 days.

Samples (U/L)	Within-Run Precision		Between-Run Precision	
	SD (U/L)	CV (%)	SD (U/L)	CV (%)
30.0	0.170	0.59	0.090	1.70
140.0	0.286	0.20	0.110	0.51

CV: Coefficient of variation; SD: Standard deviation.

RESIDUAL RISKS, WARNINGS AND PRECAUTIONS

- Use Protective Equipment in accordance with the Good Laboratory Practices.
- Follow the Good Laboratory Practices' instructions to establish the quality of water.
- Do not mix reagents from different lots or exchange the caps from different reagents in order to avoid cross contamination. Do not use the reagent if it displays any signs in disagreement with the ones specified in the product MSDS.
- Avoid leaving reagents outside the specified storage conditions.
- The level of the water bath must be greater than that of the test tubes containing the reaction.

REFERENCE RANGES

Serum and Plasma	0 - 15 U/L
Pleuroperitoneal Fluid	0 - 30 U/L
Cerebrospinal Fluid	0 - 9 U/L

These values are intended for orientation only. It is recommended that each laboratory establishes its own reference ranges.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- Discard the reactions surplus according to the Good Laboratory Practices, in a proper place for potentially infectious material.
- The information for Disposing, Security and First Aid are described in the Manual Safety Data Sheet (MSDS) of this product available at www.biotecnica.ind.br or calling for +55 35 3214 4646

QUALITY ASSURANCE / CUSTOMER TECHNICAL SERVICE

All Biotécnica products are made according to the Good Manufacturing Practices and other current sanitary regulations. Their performance is assured as long as all Biotécnica instructions are followed. In case of doubt while using the product, contact our Scientific Advisory team by calling +55 35 3214 4646, your local distributor or sending an e-mail to sa@biotecnica.com.br.

ESPAÑOL**FINALIDAD**

Kit destinado a la determinación de adenosina deaminasa (ADA) en muestras de suero, plasma, líquido pleural y fluido cerebroespinal. Uso diagnóstico *in vitro*.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- Conservar de 2 a 8 °C, permaneciendo fuera de la temperatura especificada solamente el tiempo necesario para la realización de los ensayos. Mantener al abrigo de la luz.
- Reactivos listos para uso.
- Es recomendable realizar la calibración del producto cada dos semanas.
- Después de abierto, el producto es estable hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja desde que almacenados en las condiciones recomendadas (2 a 8 °C).
- No usar reactivos cuya fecha de vencimiento haya expirado.

PRINCIPIO DEL MÉTODO**Método:** Enzimático – Peroxidasa

La adenosina deaminasa (ADA) promueve la desaminación enzimática de la adenosina en inosina, que es convertida en hipoxantina a través de la purina nucleósido fosforilasa (PNP). La xantina oxidasa (XOD) cataliza la conversión de la hipoxantina en ácido úrico y peróxido de hidrógeno, o cual reacciona con el TOOS y 4-aminoantipirina, bajo la acción de la peroxidasa, para generar la quinoneimina. Esta es espectrofotométricamente medida en 546 nm. A intensidad del color es proporcional a la concentración de adenosina deaminasa en la muestra.

MUESTRAS: TIPO, RECOLECCIÓN, MANIPULACIÓN Y CONSERVACIÓN

Tipo de Muestra: suero, plasma (EDTA o de heparina), líquido pleural y fluido cerebroespinal.

Recolección y Manipulación: realizar la recolección de muestras de acuerdo con las Buenas Prácticas del Laboratorio Clínico. Todas las muestras deben ser tratadas como materiales potencialmente infectantes.

Conservación:

	Temperatura	Período de Estabilidad
Suero y Plasma	2 a 8 °C	2 semanas
	-20 °C	6 meses
Fluido Cerebroespinal	2 a 8 °C	1 semana
	-20 °C	1 mes
Líquido Pleural	-20 °C	6 días

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

R 1	Tris-HCl buffer 25 mmol/L pH 8,0; peroxidasa 100 U/L; 4-aminoantipirina 4 mmol/L; PNP 300 U/L; XOD 400 U/L	X
R 2	Tris-HCl buffer 25mmol/L pH 4,0; adenosina 11,0 mmol/L; TOOS 4,0 mmol/L; preservativo.	X
CAL	Hepes buffer 50 mmol/L; adenosina deaminasa 50 U/L. Rastreável ao material de referência BCR-647.	
CONTROL 1	Hepes buffer 50 mmol/L; adenosina deaminasa \approx 30 U/L	
CONTROL 2	Hepes buffer 50 mmol/L; adenosina deaminasa \approx 130 U/L	

CONTROL DE CALIDAD

El uso de controles debe ser práctica rutinera en el laboratorio. Para Control Interno de Calidad del laboratorio se recomienda el uso del control siguiente:

Calibrador – ADA CAL	XX.XXX.XX
Control Nivel 1 – ADA CONTROL 1	XX.XXX.XX
Control Nivel 2 – ADA CONTROL 2	XX.XXX.XX

MATERIAL NECESARIO PARA REALIZAR EL ENSAYO

- Espectrofotómetro o fotómetro para lectura en 546 nm.
- Baño de agua termostático a 37 °C y tubos de ensayo.
- Pipetas de vidrio y/o automáticas, reloj o cronómetro.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO, CÁLCULOS E INTERPRETACIÓN**A) PROCEDIMIENTO DE ENSAYO**

Este producto es automatizado en la mayoría de los analizadores. Los protocolos están disponibles en www.biotecnica.ind.br

Tipo de reacción	Cinética / Crescente
Longitud de onda	546 nm
Temperatura	37 °C
Volumen de muestra*	5 μ L
Volumen de R1*	180 μ L
Incubación R1 + Muestra	300 segundos
Volumen de R2*	90 μ L
Incubación R1 + Muestra + R2	210 segundos
Medir la absorbancia continuamente por 90 segundos	
Calibración	2 puntos

*Los volúmenes pueden ser modificados desde que mantenida la proporción establecida.

B) CÁLCULOS

El equipo calcula automáticamente la concentración del analito en cada muestra.

Q) INTERPRETACIÓN

La adenosina deaminasa (ADA) es ampliamente distribuida en varios tejidos del cuerpo humano, siendo encontrada principalmente en los linfocitos T. Actividad aumentada de la adenosina deaminasa del suero es observada en la hepatitis aguda, fibrosis hepática alcohólica, hepatitis crónica activa, cirrosis, hepatitis viral y puede ser observada en el exudado de tuberculosis. En conjunto con ALT u γ -GT, la detección de la actividad de la adenosina deaminasa del suero en pacientes es de gran valor para el diagnóstico de enfermedad del hígado y su determinación en otras muestras de fluido corporal puede ayudar a diferenciar el diagnóstico de tuberculosis.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

Intervalo Operacional
3,0 a 200,0 U/L

Para valores superiores al del intervalo operacional, diluir la muestra con NaCl 150 mM (0,9%), realizar nuevo ensayo y multiplicar el resultado por el factor de dilución.

Sensibilidad	
Límite de Detección	Límite de Cuantificación
0,88 U/L	1,17 U/L

Especificidad Analítica		
Ácido Ascórbico	Hemoglobina	Triglicéridos
50 mg/dL	800 mg/dL	1000 mg/dL

Concentraciones de sustancias interferentes hasta los valores presentados anteriormente no provocan cambios significativos en los resultados. Para medicamentos, consultar la referencia recomendada (Young, 2000).

Exactitud	
Número de Muestras	40 muestras
Ecuación de regresión	$y = 1,0224x + 0,0066$
Coefficiente de Correlación (R)	0,9994

la precisión del producto fue avalada con el material de referencia BCR-647, en el nivel de decisión de 30,6 U/L, siendo el error sistemático total de 1,53%.

Predicción:

Los estudios de precisión intra-ensayo fueron realizados con 20 muestras en una carrera analítica; los de precisión inter-ensayo fueron realizados con 5 repeticiones por 5 días.

Muestras (U/L)	Precisión Intra-Ensayo		Precisión Inter-Ensayo	
	SD (U/L)	CV (%)	SD (U/L)	CV (%)
30,0	0,170	0,59	0,030	1,70
140,0	0,286	0,20	0,110	0,51

CV: Coeficiente de variación; SD: Desviación estándar.

RIESGOS RESIDUALES, CUIDADOS E PRECAUCIONES

- Utilizar los EPI's de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio Clínico.
- Seguir los requisitos establecidos en las Buenas Prácticas de Laboratorio Clínico para el agua utilizada en el laboratorio.
- No mezclar reactivos de lotes diferentes o cambiar las tapas de los frascos, a fin de evitar contaminación cruzada. No usar el reactivo cuando presente característica visual en desacuerdo con lo especificado en la FISPQ del producto.
- Evitar dejar los reactivos fuera de las condiciones de almacenamiento especificadas.
- El nivel de agua del baño maría debe ser superior al de los tubos de ensayo que contienen las reacciones.

INTERVALO DE REFERENCIA

Suero y Plasma	0 - 15 U/L
Líquido Pleural	0 - 30 U/L
Fluido Cerebroespinal	0 - 9 U/L

Estos valores son únicamente para orientación, siendo recomendable que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia.

ALERTAS Y PRECAUCIONES PARA EL DESCARTE DEL PRODUCTO

- Las informaciones de Descarte, Seguridad y Primeros Socorros están descritas en la Ficha Individual de Seguridad de Productos Químicos (FISPQ) de este producto, disponible en www.biotecnica.ind.br o por el teléfono +55 35 3214 4646.
- Desechar las sobras de las reacciones de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio Clínico (BPLC) y Programa de Gestión de Residuos de Servicio de Salud (PGRSS).

GARANTIA DE CALIDAD / SAC - SERVICIO DE ASISTENCIA AL CLIENTE






Los reactivos Biotécnica son producidos de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación e otras regulaciones vigentes. Su desempeño es asegurado siempre que se siga las instrucciones de la Biotécnica. Cualquier duda en la utilización de este kit, entrar en contacto con la Asesoría Genética de la Biotécnica Ltda, a través del teléfono +55 35 3214 4646 o por el e mail sac@biotecnica.com.br.

APRESENTAÇÕES / PRESENTATIONS / PRESENTACIONES

1	R1	2 x 15 mL
	R2	1 x 15 mL
	CAL	1 x 1 mL
	ADA CONTROL 1	1 x 1 mL
	ADA CONTROL 2	1 x 1 mL

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES/REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- UNGERER, J. P. et al. Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. *Clinical chemistry*, v. 38, n. 7, p. 1322-1326, 1992.
- SHI, P.; LI, W.; LI, Y. The clinical significance of serum adenosine deaminase determination in chronic hepatitis B patients [J]. *Laboratory Medicine*, v. 6, 2009.
- YOUNG, D.S. Effects of drugs on clinical laboratory tests - vol. 2, 5 ed. Washington DC: AACC Press, 2000.
- WESTGARD, J. O. et al. A multi-rule shewhart chart quality control in clinical chemistry. *Clin. Chem.* v.27 p.493-501, 1981.

TABELA DE SÍMBOLOS INTERNACIONAIS / TABLE OF INTERNATIONAL SYMBOLS / TABLA DE SÍMBOLOS INTERNACIONALES			
	Consultar as instruções para utilização Consult instructions for use Consultense las instrucciones de uso		Descartar corretamente Dispose properly Desechar adecuadamente
REF	Número de catálogo Catalog number Número de catálogo	R 	Reagente Reagent Reactivo
LOT	Código do lote Batch code Código de lote		Limite de temperatura Temperature limitation Limite de temperatura
IVD	Produto para a saúde para diagnóstico <i>in vitro</i> In Vitro Diagnostic medical device Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>		Validade Use by date Fecha de Caducidad
CAL	Calibrador Calibrator Calibrador	X	Nocivo / Irritante Harmful / Irritant Nocivo / Irritante