

DANIEL HOLANDA BARROSO

**PD-L1 PODE MEDIAR A EXAUSTÃO DE CÉLULAS T EM UM CASO DE
LEISHMANIOSE CUTÂNEO DIFUSA CAUSADA PELA LEISHMANIA (L.)
AMAZONENSIS**

Brasília, 2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DANIEL HOLANDA BARROSO

**PD-L1 PODE MEDIAR A EXAUSTÃO DE CÉLULAS T EM UM CASO DE
LEISHMANIOSE CUTÂNEO DIFUSA CAUSADA PELA LEISHMANIA (L.)
AMAZONENSIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio.

Estudante: Daniel Holanda Barroso.

Brasília, 2019

DANIEL HOLANDA BARROSO

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 18 de fevereiro de 2019

Banca examinadora

Presidente: Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio

Universidade de Brasília – UnB

Membros:

Albino Verçosa Magalhães

Universidade de Brasília – UnB

Izelda Maria Carvalho Costa

Universidade de Brasília – UnB

Suplente

Ciro Martins Gomes

Universidade de Brasília – UnB

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus Pais, Abedias e Maria Cordeira, e a meus irmãos Rafael e Emanuel que sempre me ajudaram e compreenderam.



AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, minha orientadora, pela sabedoria, disciplina e disponibilidade de sempre me apoiar em meus projetos.

Ao Prof. Dr. Ciro Martins Gomes pelos conselhos e confiança em mim depositados que me fizeram sempre querer melhores resultados.

À Prof^a. Dra. Cecilia Beatriz Fiuza Favali que me ajudou a compreender um pouco o árduo campo da Imunologia e foi junto com minha orientadora, o elo capaz de possibilitar o trabalho conjunto de muitos profissionais.

À Prof^a. Dra. Beatriz Dolabela de Lima que foi essencial para a realização da parte de biologia molecular.

À Prof^a. Dra. Sarah De Athayde Couto Falcão pelos ensinamentos e organização ímpar que possibilitou a realização dos estudos in vitro.

À Prof^a. Dra. Izelda Maria Carvalho Costa pelos ensinamentos e pela atitude sempre acolhedora.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Soares Takano pelos ensinamentos no campo da patologia, por auxiliar na discussão da parte de histopatologia e por confeccionar as fotografias das lâminas de exame histopatológico.

À Abedias da Rocha Barroso, meu pai, e Maria Codeira Holanda Barroso, minha mãe, pela ajuda da resolução de formalidades necessárias a concretização deste projeto.

À Dra. Jorgeth de Oliveira Carneiro da Motta pela empolgação contagiante com a Leishmaniose.

À Profa. Dra. Carmen Déa Ribeiro de Paula pela compreensão, disponibilidade e confiança.

Ao Albino Verçosa Magalhães pela sabedoria e por ter trazido este caso a nosso conhecimento.

À Laís Sevilha dos Santos e Tércio Rodrigues que possibilitaram a realização dos exames de parasitologia.

Ao instituto de Biologia da Universidade de Brasília que disponibilizou os o espaço físico e equipamentos para a realização do estudo in vitro.



A Faculdade de Medicina da universidade de Brasília que disponibilizou o espaço físico e equipamentos para a realização dos exames parasitológicos.

Ao Hospital Universitário de Brasília que disponibilizou o espaço físico para a realização do estudo.

RESUMO

Introdução: A leishmaniose cutânea difusa é uma forma rara da leishmaniose tegumentar americana associada à infecção pela *Leishmania (L.) amazonensis* no Brasil. Representando o polo anérgico da Leishmaniose tegumentar americana, as explicações para a sua resistência ao tratamento ainda são obscuras. **Objetivos:** Investigar o papel da via PD1/PD-L1 na exaustão celular da leishmaniose cutânea difusa causada por *Leishmania (L.) amazonensis*, através de experimento *ex vivo* e *in vitro* após 48h de estímulo com o antígeno de *Leishmania (L.) amazonensis*. **Métodos:** A definição do caso de leishmaniose cutânea difusa foi realizado de acordo com os critérios clínicos, laboratoriais e histopatológicos presentes na literatura e através da identificação da espécie de *Leishmania* responsável. Clinicamente o sujeito apresentava placa eritematosa elevada em dorso nasal de crescimento lento e que surgiu durante viagem à região Amazônica, a imunofluorescência indireta e a intradermo reação de Montenegro foram negativas, a cultura e o exame direto da lesão foram positivos para *Leishmania spp.* A reação em cadeia da polimerase ITS1PCR identificou *Leishmania (L.) amazonensis*. O sangue periférico do sujeito da pesquisa foi colhido para o experimento 11 meses após o início do tratamento, quando o mesmo já não apresentava lesão clinicamente evidente. As células mononucleares de sangue periférico foram analisadas *ex vivo* e *in vitro* após 48 horas de estimulação com antígeno solúvel de *Leishmania (L.) amazonensis*. As células foram marcadas para proteínas de superfície celular possivelmente envolvidas na patogênese da leishmaniose cutânea difusa, segundo estudos anteriores [CD14, CD40, CD44, CD80, ligante da proteína de morte celular programada 1 (PD-L1), HLA-DR, CD86, CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD45RA, e CD25], bem como para as moléculas intracelulares interferon gama e granzima B e para marcadores de morte celular. Foi realizada revisão narrativa da literatura de forma a correlacionar os achados do estudo aos já descritos por outros trabalhos. **Resultados:** A análise das moléculas de superfície mostrou expressão de PD-L1, um ligante inibitório, nos monócitos estimulados com o antígeno solúvel de *Leishmania* (65% das células), enquanto em monócitos não estimulados (controle negativo), esta molécula foi expressa em apenas 35% das células. Por outro lado, observamos uma diminuição de linfócitos CD4+IFN- γ + (8.32% versus 1.7%) e de linfócitos CD8+ IFN- γ + (14% versus 1%), quando comparamos as células estimuladas com o controle negativo. Um decréscimo relevante na expressão de granzima B em células T CD8+ após o estímulo com o antígeno solúvel de *Leishmania* também foi observado, estando presente em 31% no controle negativo, mas somente em 5% no grupo que recebeu o estímulo. A expressão de moléculas coestimulatórias CD40 e CD86 foi semelhante entre as células que receberam o estímulo do SLA e o controle negativo. **Conclusão:** A ativação da via inibitória PD-L1 após a reestimulação com o antígeno de *Leishmania* pode estar relacionada a expressão diminuída de IFN- γ em linfócitos T CD8+ e CD4+, e de granzima B em linfócitos T CD8+. A ativação desta via inibitória é uma das hipóteses para explicar a falta de resposta ao tratamento de paciente com leishmaniose difusa ou LCD. **Palavras chave:** Leishmaniose Cutânea Difusa, Exaustão celular, PD-L1, Imunologia.

ABSTRACT

Introduction: Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL) is a rare disease form associated with *L. (L.) amazonensis* in South America. It represents the “anergic” pole of American Tegumentary leishmaniasis and the explanation for its resistance to treatment remains elusive. **Objectives:** Investigate role of PD-1/PD-L1 pathway in the cellular exhaustion of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) amazonensis* through an ex-vivo and in vivo experiment after 48hs stimulation with *Leishmania (L.) amazonensis* antigen. **Objetivos:** Investigar o papel da via PD1/PD-L1 na exaustão celular da leishmaniose cutânea difusa causada por *Leishmania (L.) amazonensis* através de experimento *ex vivo* e *in vitro* após 48h de estímulo com o antígeno de *Leishmania (L.) amazonensis*. **Methods:** The definition of diffuse leishmaniasis in the subject was made through clinical, laboratorial, histopathological criteria reported in the literature and through the identification of the responsible *Leishmania* species. Clinically the subject presented with a slowly growing elevated erythematous plaque in the dorsum nasi that appeared during a trip to the Amazonian region, indirect immunofluorescence was negative, Montenegro’s skin reaction was negative, culture and direct examination of the lesion were positive for *Leishmania spp.* Polymerase chain reaction ITS1PCR identified *Leishmania (L.) Amazonensis*. Subject’s peripheral blood was collected for the experiment 11 months after treatment beginning, and he no longer presented with clinically evident lesion at this time. Peripheral blood mononuclear cells were analyzed *ex vivo* and *in vitro* after 48h of stimulation with soluble *L. (L.) amazonensis* antigen. The cells were labeled for surface proteins possibly involved in the pathogenesis of diffuse leishmaniasis according to previous studies [CD14, CD40, CD44, CD80, Programed death ligand 1 (PD-L1), HLA-DR, CD86, CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD45RA, e CD25] as well as for intracellular molecules IFN- γ and granzyme B and for cell death markers. Their positivity the markers was evaluated with the use of flow cytometry. The immunological findings were compared to the existent in the literature through a narrative review. **Results:** We observed increased expression of PD-L1, an inhibitory ligand, in monocytes stimulated with soluble leishmania antigen (in 65% of cells), when in the unstimulated monocytes (negative controls), it was expressed in only 35% of cells. Conversely, the expression of CD4+IFN- γ + in T lymphocytes (8.32% versus 1.7%) and CD8+ IFN- γ + in T lymphocytes (14% versus 1%) decreased when compared with negative controls. A relevant decrease in the granzyme B expression in the CD8+T cells after the stimulation with soluble leishmania antigen was also observed, being present in 31% in the negative controls but in only 5% in the group that received the stimulus. There was a similar expression of costimulatory molecules CD40 and CD86 between the cells that received the SLA stimulus and the negative control. **Conclusion:** The activation of PD-L1 inhibitory pathway after *Leishmania* antigen stimulation could be related to the reduced levels of IFN- γ in CD8+ and CD4+ T cells and granzyme B in CD8+ T cells. The activation of this inhibitory pathway is one of the hypotheses to explain the lack of response to conventional treatment in a patient with diffuse leishmaniasis.

Keywords: Diffuse cutaneous Leishmaniasis, Cellular exhaustion, PD-L1, immunology

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 — Ilustração presente no artigo de Montenegro de 1926, no qual o autor descreve a formação de vesícula, após reação ao extrato de Leishmania(6).21
- Figura 2 — Estado da endemidade de Leishmaniose cutânea no mundo em 2015 segundo a OMS-(disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 06 nov. 2018).23
- Figura 3 — Mapas da distribuição geográfica da leishmaniose- Fonte - Aronson e cols. 2017(17).25
- Figura 4 — Casos confirmados de leishmaniose em 2015 - WHO 2017.(Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_CP_disease_distribution_BRA_2015/en/>. Acesso em: 06 nov. 2018.)- Ref: -(34)26
- Figura 5 — Casos de Leishmaniose difusa relatados até 2005 segundo JML Costa 2009. (Ref: 33)(57).....28
- Figura 6 — Úlcera de bordas elevadas típica de Leishmaniose- Fonte: Arquivo pessoal.....32
- Figura 7 — Leishmaniose disseminada em paciente envolvendo tronco e membros. Fonte- Ref(95).....32
- Figura 8 — Aspectos clínicos da Leishmaniose mucosa em diferentes fases da doença segundo Lessa(108) . (A) Lesões nodulares (setas) sem ulceração ao longo da ponta nasal, conchas nasais inferiores e septo (estágio I). (B) Lesões granulares finas, caracterizadas por ulcerações superficiais observadas nas conchas nasais inferiores e o assoalho da fossa nasal (estágio II). (C) Ulcerações profundas com reação tecidual mais intensa e granulação tecidual claramente visível e infiltração da mucosa (estágio III). (D) O septo nasal cartilaginoso é perfurado (seta) com granulação tecidual visível e infiltração da mucosa do septo nasal posterior e conchas nasais inferiores (estágio IV, forma ativa). IC: conchas inferiores; S: septo- Fonte- Ref-(108).....34
- Figura 9 — Placas, nódulos e pápulas não ulceradas em paciente com Leishmaniose difusa. Fonte: Ref(138).....37

- Figura 10 — Intradermoreação de Montenegro: após a aplicação intradérmica de um solução contendo preparação antigênica de formas promastigotas de *Leishmania*. O resultado deve ser avaliado dentro de 48 horas, com uma caneta esferográfica, é positivo caso se forme uma pápula maior ou igual a 5mm. Fonte- Ref (7) 40
- Figura 11 — A e B- Coleta do esfregaço por pressão de fragmento de lesão de acordo com Sousa e col. C- Esfregaço obtido por este método mostrando duas formas amastigotas de *Leishmania* spp (setas longas), com núcleos (setas curtas) e cinetoplastos (ponta de seta); 4- Formas amastigotas em cortes histológicos (setas longas), com núcleos (seta curta) em uma observa-se cinetoplasto (ponta de seta). 43
- Figura 12 — Caso de LCD polar segundo Bittercourt- A: Atrófia epidérmica, Faixa de Unna e difusa Infiltração de macrófagos vacuolados e parasitados. Profundamente a discreto infiltrado mononuclear (HE, aumento original 100); B- LCD Polar. Epiderme com acantose invadida por macrófagos parasitados. Há destruição da camada basal da epiderme e aspecto macrofágico na derme (HE, Aumento original 125). Fonte: Bittencourt(221). 49
- Figura 13 — Caso de LCD subpolar segundo Bittercourt- A- Presença de vários eosinófilos (HE, Aumento original 125); Presença de múltiplas áreas de necrose citolítica (HE, Aumento original 250). Fonte- Bittencourt(221). 50
- Figura 14 — Papel dos macrófagos nos diferentes estados patogênicos durante a infecção por *Leishmania*. O macrófagos humanos parasitados por *Leishmania* spp. são sujeitos a regulação por citocinas presentes na pele e no local da infecção. Citocinas inflamatórias do tipo 1, IFN- γ e TNF- α , podem sinergicamente induzir a produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos, levando a inibição da replicação de *Leishmania* dentro do fagolisossomo. LT Th17 estão aumentados no infiltrado inflamatório da LM. Mediadores quimioatrativos (IL-8, MCP-1, CXCL9 e CXCL10) e mediadores associados com a ativação clássica (Tipo 1) de macrófagos (iNOS, IL-1 β) tem sido descritos em lesões inflamatórias de LC. No ambiente imunorregulatório (a esquerda), existem baixos níveis de citocinas tipo 1 e ausência de efetores microbicidas. Mediadores derivados de LT ou de macrófagos incluindo citocinas do tipo 1, IL10 e TGF- β antagonizam os efeitos de IFN- γ e TNF e podem resultar em proliferação parasitária. Receptores inibitórios em células CD8+ e CD4+ (PD-1, CTLA-4, LAG3) e seus contra ligantes (CD80, CD86, CD-L1) são associados a exaustão de LT. **IFN- γ** : interferon gama, **TNF- α** : Fator de necrose tumoral alfa; **IL-10**: interleucina 10, **TGF- β** : Fator de transformação do crescimento beta; **ROS**: Espécies

reativas de oxigênio; **ACDL**: Leishmaniose cutâneo difusa; **PKDL**: Leishmaniose dérmica pós calazar; **LCL**: Leishmaniose cutâneo localizada; **LR**: Leishmaniose residivans cútis; **DL**: Leishmaniose disseminada; **MCL**: Leishmaniose mucocutanea; **DHT**: Hipersensibilidade retardada do tipo 1; **Th**: Células T auxiliares; **MCP**: Proteína quimiotática de monócitos; **CXCL**: ligante e quimiocina CXC; **CTLA-4**: Antígeno 4 do linfócito T citotóxico; **PD-1**: proteína de morte programada 1; **LAG3**: gene de ativação de linfócito 3; **PD-L1**: Ligante 1 de morte programada. Adaptado de Scorza e cols. 2017(241).53

Figura 15 — Modelo de ativação de célula T. A ligação do sinal um apenas resulta em inativação, enquanto a ativação requer tanto o sinal 1 como o sinal 2. Adaptado de Bretcher e cols.(243).....54

Figura 16 — Modelo simplificado da coestimulação mediada pela via B7:CD28/CTLA-4. Para completa ativação, os LT requerem pelo menos dois sinais da célula apresentadora de antígenos (APC). O sinal 1 e antígeno específico e é enviado LT por meio do receptor de célula T (TcR) pela ligação deste ao complexo antígeno + MHC II. O sinal co-estimulatório, ou sinal 2, é enviado principalmente por B7-1(CD80) e B7-2(CD86) na célula apresentadora de antígeno e é essencial para a proliferação de LT, para a produção de linfocinas e para a sobrevivência celular. Ligação do CD28, expresso em células T virgens e T ativadas aos CD80 ou CD86 nas células apresentadoras de antígenos (APC) resulta em sinal co-estimulatório positivo. Em contraste, a ligação ao CTLA-4, expresso em células T ativadas, pelas mesmas moléculas resulta em resposta negativa ou coinibitória. Adaptado de Karandikar 1998(250).....55

Figura 17 — Destino do LT após diferentes estímulos do TCL- Reconhecimento simultâneo do complexo MHC-peptídeo pelo receptor de célula TCR e B7-1(CD80) ou B7-2(CD86) pelo receptor co-estimulatório CD28 resulta na ativação de célula T. Na ausência da ligação de CD28, o LT se torna apoptótico ou fica anérgico. Após a ativação do LT e aumento da expressão de CTLA-4 (ou CD152), coligação TCR e CTLA-4 resulta em parada do ciclo celular e fim da ativação do LT. Adaptado de Alegre 2001(245).....56

Figura 18 — Durante a apresentação de antígenos pelo MHC a célula apresentadora de antígeno pode entregar um segundo sinal estimulatório, no exemplo CD80/CD86. Este sinal provocará a diferenciação do linfócito T virgem em uma célula efetora com proliferação linfocitária, aumento de citotoxicidade e de citocinas como IFN- γ . Em algumas situações como infecções crônicas, as células apresentadoras podem levar a produção de um segundo sinal inibitório, no caso o PD-1. A presença deste sinal pode então

- levar a diminuição das funções citotóxicas, da proliferação e da produção de citocinas pelos linfócitos. Adaptado de Freeman e cols. 2006(259).57
- Figura 19 — Modelo de perda hierarquica de função de LT durante infecção viral crônica. Linfócitos T de memória persistem na ausência de antígenos após uma infecção aguda e são completamente funcionais e capazes de síntese imediata de IFN- γ , TNF- α e IL-2 após reencontro com o antígeno (parte superior da figura). Persistência viral resulta em disfunção de LT CD8+ em vários estágios (parte inferior da figura). LT funcionais pode coexistir com o vírus se o encontro com o antígeno for infrequente. Exaustão parcial “I” representa um estágio em qual a expressão de IL-2 e TNF- α está comprometida, mas é mantida a expressão de IFN- γ . Exaustão parcial “II” representa um estágio em que a produção de IFN- γ também se torna comprometida. Neste momento algumas células produtoras de IFN- γ ainda podem ser detectadas, mais muitas estão exaustas. Completa exaustão é a perda total das funções efetoras incluindo a produção de IL-2, TNF- α e IFN- γ . Finalmente, deleção de LT CD8+ epitopo específico pode ocorrer se a apresentação do epitopo aos LT for alta ou sustentada. Esta perda hierarquica da função é dramaticamente influenciada pelo antígeno, sendo que na presença de baixos níveis do vírus, LT mantém a capacidade funcional, mas a medida aumenta a carga viral, funções efetoras são perdidas progressivamente. Finalmente, um alta carga antigênica leva deleção de LT antígeno específicos. Adaptado de Wherry 2003 e cols.(291).59
- Figura 20 — placa eritematosa em dorso nasal-pequena crosta serohemática presente se refere ao local da biópsia. Foto retirada antes de qualquer tratamento.72
- Figura 21 — Exame histopatológico (data da coleta 09/12/2015) Infiltração celular que se estende da derme papilar até a derme profunda (Hematoxilina e eosina- Objetiva de 4x).....73
- Figura 22 — Exame histopatológico (data da coleta 09/12/2015). Infiltrado é composto majoritariamente por histiócitos vacuolizados que não formam granulomas. Não são observadas células gigantes (Hematoxilina e eosina-Objetiva de 40x).....73
- Figura 23 — Exame histopatológico (data da coleta 09/12/2015). Em grande aumento é possível observar a presença de numerosas estruturas intracelulares compatíveis com amastigotas no interior dos histiócitos vacuolados. (Hematoxilina e eosina- Objetiva de 100x).....74

Figura 24 — Fotos da lesão do paciente um mês após o tratamento convencional	75
Figura 25 — Aspecto do dorso nasal a época da coleta do sangue para o experimento.	76
Figura 26 - Expressão ex vivo de marcadores estudados na superfície de monócitos derivados de PBMC.	78
Figura 27- Expressão ex vivo de marcadores da superfície de linfócitos derivados de PBMC.	79
Figura 28 - Avaliação de apoptose e morte celular através do ensaio de iodeto de propídio e anexina 5, as células encontravam-se viáveis.....	79
Figura 29 - Expressão in vitro de PD-L1 em monócitos após 48hs de estímulo com SLA e nos controles positivo e negativo.	80
Figura 30 - Expressão in vitro de IFN- γ e granzima B em linfócitos CD8+ e de IFN- γ em linfócitos CD4+ após 48hs de estímulo com SLA e nos controles positivo e negativo.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Resultados de exames realizados durante acompanhamento do paciente.....	77
Tabela 2 - Expressão de moléculas de superfície de monócitos ex vivo e in vitro. As PBMCs do paciente foram marcadas com anticorpos específicos contra moléculas se superfície de monócitos. As moléculas foram analisadas na superfície de monócitos separados por tamanho (FSC) e granulosidade(SSC).....	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 — Espécies de Leishmania que causam doença humana - Adaptada de Reithinger e cols., referência(15).	24
Quadro 2 — Padrões histopatológicos da Leishmaniose tegumentar.	46
Quadro 3 — Achados Histopatológicos segundo a forma clínica. Adaptados de Choi e cols 2002(214).	47
Quadro 4 — Comparação entre Exaustão e anergia.	60
Quadro 5 - Resumo das principais características e achados dos estudos incluídos.	83
Quadro 6 - Principais alterações Imunológicas da Leishmaniose difusa.....	105



LISTA DE ABREVIÇÕES E SINÔNIMOS

- CCL: Ligante de Quimiocina CC (Do inglês chemokine (C-C motif) ligand)
- CCR: Receptor de Quimiocina (Do inglês chemokine (C-C motif) Receptor)
- CD: Cluster of Differentiation- Grupamento de diferenciação
- CE-FM: Concelho de Ética da Faculdade de Medicina
- CLA: Antígeno Linfocítico Cutâneo (Do inglês Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen)
- CLTA-4: Antígeno 4 do Linfócito T Citotóxico (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4)
- ConA: Concanavalina A
- CPPI: Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos
- CS: Controles Sem Leishmaniose
- CTLL: Linhagem de Linfócitos T Citotóxicos-(do Inglês- cytotoxic T lymphocyte Lineage)
- CXCL: Ligante de Quimiocina CXC (Do inglês chemokine (C-X-C motif) ligand)
- CXCR: Receptor de Quimiocina CXC (Do inglês chemokine (C-X-C motif) receptor)
- DALYs- Anos de Vida Ajustados por Incapacidade (Do inglês- Disability Adjusted Life Years)
- DHT: Hipersensibilidade do Tipo Retardado (Do inglês- Delayed Type hypersensitivity)
- dsRNA: Acido Ribonucleico de Dupla Hélice
- ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
- FBS: Soro Bovino Fetal (Do inglês: fetal bovine serum)
- Fc: Região “Fragmentos Cristalizáveis” (Do inglês: fragment crystallizable region)
- FOXP3: forkhead box P3
- GIPLs: Fosfolipídios de Glicoinositol (Do inglês: Glycoinositolphospholipids)
- GP46/M2: Proteína de Promastigota de L. (L.) amazonensis
- HLA: Antígeno Leucocitário Humano
- HSP: Proteína de Choque Térmico (Do inglês: Heat shock proteins)
- ICAM: Molécula de Adesão Intracelular (Do inglês: Intercellular Adhesion Molecule)

IDRM: Intradermoreação de Montenegro
IFI: Imunofluorescência Indireta
IFN: Interferon Gama
IG : Imunoglobulinas
IL: Interleucina
IL-2r: Receptor de Interleucina 2
iNOS: Óxido Nítrico Sintetase Induzível
ITS- Espaçador Interno Transcrito (Do inglês: Internal transcribed spacer)
JAK: Janus Quinase
LAG3- Gene de Ativação de Linfócito 3
LB: Linfócitos B
LC: Leishmaniose Cutânea
LCD: Leishmaniose Cutâneo Difusa
LCI: Leishmaniose Cutânea Intermediária
LDS: Leishmaniose Cutânea Disseminada
LeIF: Fator de Iniciação Eucariótico de Leishmania 4^a(do inglês Leishmania eukaryotic initiation factor 4A)
LFA: Antígeno Associado a Função Linfocitária (do inglês Lymphocyte Function-Associated Antigen-1)
Linfócito Th1: Linfócito T Auxiliar do Tipo 1 (Do inglês T helper
Linfócito Th1: Linfócito T Auxiliar do Tipo 2(T helper 2)
Linfócito Th17: Linfócito T Auxiliar do Tipo 17 (T helper 17)
LM: Leishmaniose Mucosa
LM: Leishmaniose Mucosa
LPG: Lipofosfoglicana
LT: Linfócito T
LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana
LV: Leishmaniose Visceral
LVR1: Leishmania Vírus 1
MCP-1: Proteína Quimioattractante de Monócitos 1 (Do inglês: Monocyte chemoattractant protein)
MH: Hanseníase
MHC: Complexo Maior de Histocompatibilidade



MIP-1 alfa Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 Alfa (Do inglês: Macrophage inflammatory protein 1 alpha)

mRNA: Acido Ribonucleico Mensageiro (Do inglês: messenger RNA Ribonucleic acid)

NASBA: Amplificação Baseada em Sequência de Ácido Nucleico (do inglês: Nucleic acid Sequence Based Amplification)

NF-κB: Factor Nuclear Kappa B (do inglês Nuclear factor kappa B)

NK: Exterminadoras Naturais (do inglês Natural killer)

NMG: Antimoniato de n-metil Glucamina

NNN: McNeal, Novy & Nicolle

OMS: Organização Mundial da Saúde

ON: Óxido Nítrico

PBMC: Células Mononucleares do Sangue Periférico (Do inglês Peripheral blood Mononuclear cells)

PCR Reação em Cadeira da Polimerase (Do inglês polymerase chain reaction)

PD-1: Proteína de Morte Programada 1 (Do inglês Programmed cell death protein 1)

PD-L: Ligante de Morte Programada (Do inglês Programmed death-ligand)

PHA: Fitohemaglutinina (Do inglês phytohemagglutinin)

PI: Iodeto de Propídio (Do inglês propidium iodide)

PKR: Proteína Quinase Dependente do RNA de Dupla Hélice (Do inglês Protein kinase RNA-activated)

PPD: Derivado Proteico Purificado de Mycobacterium Tuberculosis (Do inglês: purified protein derivative)

PROM-LC: Promastigotas Vivos Derivados de Pacientes com LC

PROM-LCD: Promastigotas Vivos Derivados de Pacientes com LCD

PWM: Mitogêno de Pokeweed

QT: Quantitativo

RAG2: Gene Ativador da Recombinação 2 (Do inglês: Recombination activating gene 2)

RFLP : Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição (Restriction fragment length polymorphism)

RIMA: Rede Informática de Medicina Avançada

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio



RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SFM: Sistema Fagocítico Mononuclear

sIL-2: Receptor Solúvel de Interleucina 2

sIL-2R: Receptor Solúvel de IL-2

SLA: Antígenos Solúveis de Leishmania(Do inglês soluble Leishmania antigens)

SLA-LC: Antígeno Solúvel de Leishmania Derivado de Pacientes com LC

SLA-LCD: Antígeno Solúvel de Leishmania Derivado de Pacientes com LCD

SOD1: Superóxido Desmutase

STAT: Transdutores de Sinal e Ativadores das Proteínas de Tanscrição (Do inglês: signal transducers and activators of transcription)

TCR: Receptor de Célula T (Do inglês: T Cell Receptor)

TGF: Fator de Transformação do Crescimento (Transforming growth factor)

TIM-3: Molécula Contendo Domínios de Mucina e Imunoglobulina de célula T (Do inglês: T Cell Immunoglobulin and mucin-domain-containing molecule-3)

TLR: Receptores Tipo Toll (Do inglês: toll like receptor)

TNF: Fator de Necrose Tumoral (Do inglês tumor necrosis factor)

Treg: Células T Regulatórias

WT: Alelo Selvagem

Sinônimos

Leu-1: CD-5

Leu-4: CD-3

Leu-2a: CD-8

Leu-6 e T6: CD1a

Leu-11b: CD16

Leu-M3: CD14

Leu-M5: CD11a

LEu3a e LEu3b: CD4+

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	HISTÓRICO.....	20
1.2	SITUAÇÃO ATUAL.....	22
1.3	DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	29
1.3.1	Apresentação clínica.....	30
1.3.1.1	Leishmaniose Cutânea Localizada-(LC).....	30
1.3.1.2	Leshmaniose Cutânea Disseminada- (LDS).....	31
1.3.1.3	Leishmaniose Mucosa- (LM).....	33
1.3.1.4	Leishmaniose Cutâneo Difusa	34
1.3.2	Diagnóstico Laboratorial	37
1.3.2.1	Reação intradérmica de Montenegro (IDRM)	37
1.4	IMUNOPATOLOGIA DA LEISHMANIOSE	50
1.5	COESTIMULAÇÃO E COINIBIÇÃO E A VIA PD-1/PD-L1	54
2	OBJETIVOS	62
2.1	OBJETIVO PRIMÁRIO:	62
2.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS:	62
3	MÉTODOS	63
3.1	DIAGNÓSTICO DO SUJEITO	63
3.2	IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE DE LEISHMANIA.....	63
3.3	ANÁLISE EX-VIVO E REESTIMULAÇÃO IN-VITRO DE PBMC	64
3.3.1	Separação das células mononucleares de sangue periférico por gradiente de Ficoll.....	65
3.3.2	Marcação de moléculas de superfície em PBMC total	66
3.3.3	Experimento <i>in vitro</i>:.....	67
3.4	REVISÃO DA LITERATURA	69
4	RESULTADOS.....	71
4.1	ACOMPANHAMENTO CLÍNICO	74
4.2	EXPERIMENTOS <i>EX-VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	78
4.3	DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	81
5	DISCUSSÃO	97

5.1	PRINCIPAIS ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS DA LCD ENCONTRADAS NA LITERATURA	97
5.2	A FORMA CLÍNICA DE LEISHMANIOSE	106
5.3	ANÁLISE DOS ACHADOS <i>IN VITRO</i> E <i>EX VIVO</i>	110
5.4	LIMITAÇÕES.....	116
5.5	PERSPECTIVAS.....	117
6	CONCLUSÃO	119
7.	APENDICE.....	120
8.	REFERÊNCIAS.....	137
	ANEXOS	179
	ANEXO 1: APROVAÇÃO DO COMITÉ DE ÉTICA	180
	ANEXO II: ARTIGO APROVADO.....	184

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Evidências fósseis de mamíferos e vetores sugerem que a leishmaniose pode ter se estabelecido durante o período Paleoceno (65-31 milhões de anos atrás)(1). Em seres humanos a leishmaniose deve estar relacionada a própria origem e evolução do homem na África (1, 2). O agente etiológico da leishmaniose cutânea, chamada então “ferida de Deli”, foi primeiramente descrito como tal em 1903 por Wrigth(3). No Brasil o agente etiológico da leishmaniose tegumentar, à época denominada úlcera de Bauru, foi quase que simultaneamente identificado por Lindenberg e por Carini & Paranhos em 1909(4). Entretanto, através de análise e interpretação retrospectivas da doença; que recebia vários nomes como feridas bravas, botão da Bahia, buba-brasiliana, úlcera de Baurú; Rabello afirma que é possível afirmar que existia leishmaniose no Brasil ao menos desde 1827(5).

A ciência brasileira teve importância central na luta contra a leishmaniose cutânea desde da descoberta do tártaro emético por Gaspar Vianna em 1911(4). O estudo da imunologia da leishmaniose também foi revolucionado quando Montenegro descreveu o que chamou de “reação cutânea ao extrato de Leishmania”(6). Este teste avalia a resposta de hipersensibilidade retardada ao antígeno de Leishmania e é utilizado até os dias atuais no diagnóstico e na pesquisa desta patologia(7). Segue figura existente no artigo, em que o autor descreve a formação de vesícula, após reação ao extrato de Leishmania(Figura 1).

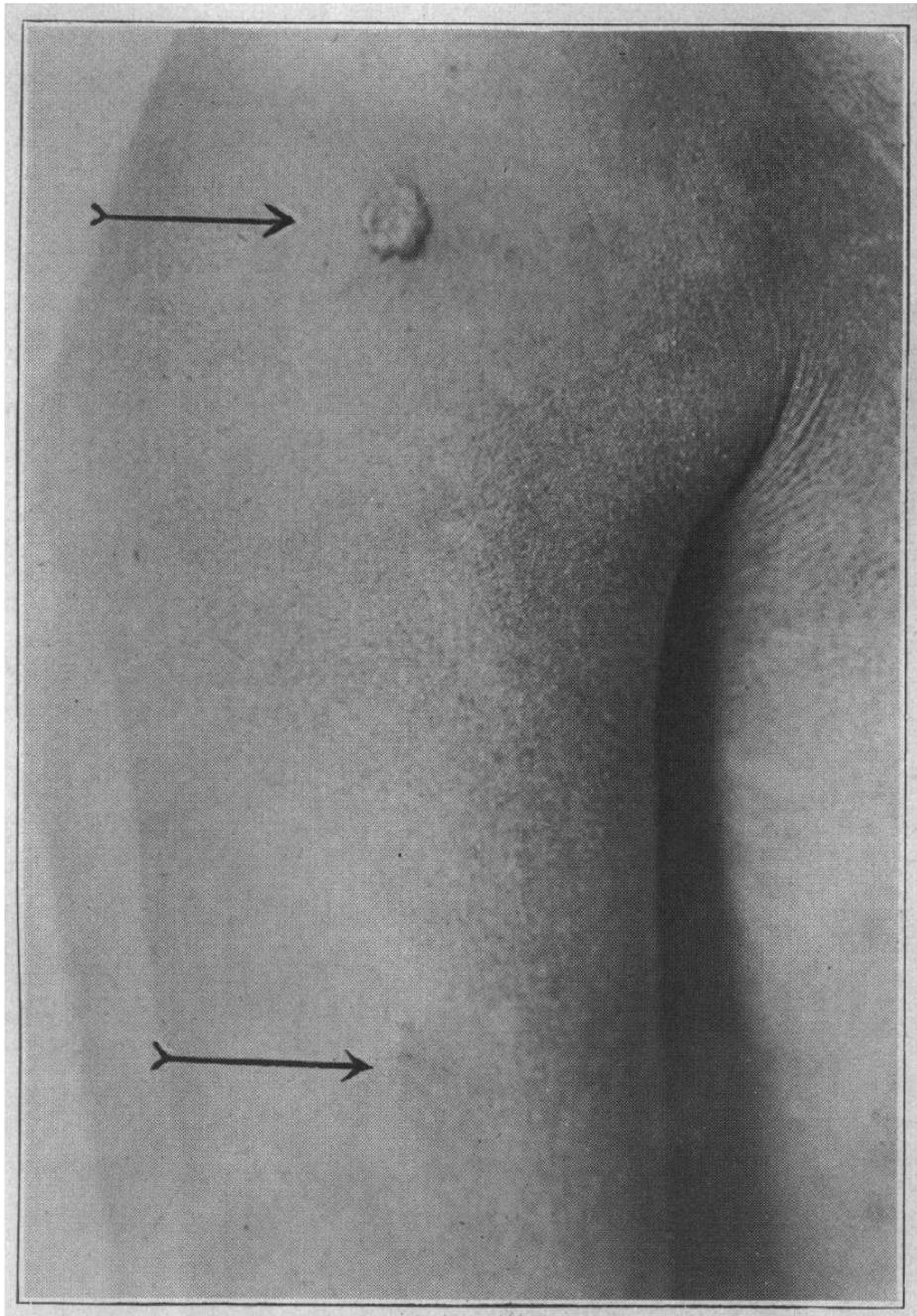


Fig. 1.—Vesicle formation skin reaction to *Leishmania* extract.

Figura 1 — Ilustração presente no artigo de Montenegro de 1926, no qual o autor descreve a formação de vesícula, após reação ao extrato de *Leishmania*(6).

As primeiras descrições completas da forma difusa (LCD) da leishmaniose foram feitas no Brasil em 1945 e nos dois anos seguintes na Venezuela e na

Bolívia(8). Desde então já é dada importância a evolução crônica e a refratariedade a terapêutica utilizada naquele momento(8).

1.2 SITUAÇÃO ATUAL

A leishmaniose é um importante problema de saúde de mundial com uma incidência estimada de 0.9 a 1.6 milhões de casos todos os anos, sendo aproximadamente 0.2 a 0.4 milhões de casos da forma visceral (LV) e 0.7 a 1.2 milhões de casos da Leishmaniose cutânea (LC)(9). A maioria dos casos da LC ocorrem nos seguintes países: Afeganistão; Argélia; Brasil; Colômbia; República Islâmica do Iran; Paquistão; Peru; Arábia Saudita e República Árabe da Síria(10). A leishmaniose cutânea antroponótica é uma preocupação no sudeste da Ásia. Esta doença é caracterizada por grandes surtos em cidades densamente povoadas de grandes cidades, especialmente em zonas de conflito, campos de refugiados e em situações onde existe grande migração populacional(10). A figura 2 mostra o estado da endemicidade na Leishmaniose cutânea a nível mundial em 2015, segundo a Organização Mundial da saúde (OMS).

Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2015

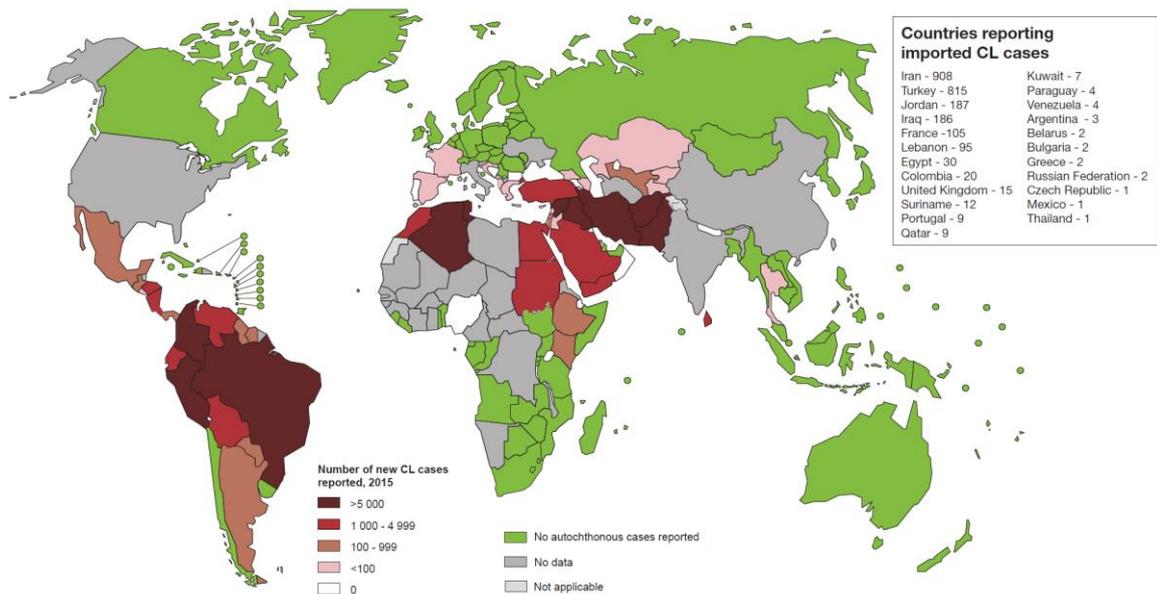


Figura 2 — Estado da endemidade de Leishmaniose cutânea no mundo em 2015 segundo a OMS-(disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>). Acesso em: 06 nov. 2018).

Além de sua grande incidência, a leishmaniose tem grande impacto na saúde populacional ao nível global, medido pelo índice de esperança de vida corrigida pela incapacidade (DALYs), tendo maior impacto que doenças como hanseníase, dengue e doença de Chagas(11). Além da possibilidade de levar à morte tanto na forma visceral como na forma tegumentar(9, 12), a leishmaniose tegumentar pode evoluir para a cronicidade e levar à deformidades, principalmente na leishmaniose mucosa (LM) e na LCD(8, 13, 14).

A complexidade clínica também vem associada a complexidade epidemiológica, sendo uma mesma espécie pode causar diversas formas clínicas da doença, como demonstrado na tabela I (Adaptada de Reithinger e cols.)(15).

Quadro 1 — Espécies de Leishmania que causam doença humana - Adaptada de Reithinger e cols., referência(15).

	Apresentações clínica principais	Ciclo de transmissão	Distribuição principal	geográfica
Leishmanias do novo mundo				
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	LC, LM	Zoonótico	América do Sul, partes da América Central e México	
<i>L. (Viannia) panamensis</i>	LC, LM	Zoonótico	norte da América do Sul e sul da América Central	
<i>L. (Viannia) peruviana</i>	LC	Zoonótico	Peru	
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	LC	Zoonótico	América do Sul	
<i>L. (Viannia) lainsoni</i>	LC	Zoonótico	América do Sul	
<i>L. (Viannia) colombiensis</i>	LC	Zoonótico	norte da América do Sul	
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	LC, LCD	Zoonótico	América do Sul	
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	LC, LCD	Zoonótico	América do Sul, México e EUA	
<i>L. (Leishmania) pifanoi</i>	LC	Zoonótico	América do Sul	
<i>L. (Leishmania) venezuelensis</i>	LC	Zoonótico	norte da América do Sul	
<i>L. (Leishmania) garnhami</i>	LC	Zoonótico	América do Sul	
Leishmanias do Velho mundo				
<i>L. (Leishmania) aethiopica</i>	LC, LCD	Zoonótico	Etiópia e Quênia	
<i>L. (Leishmania) killicki</i>	LC	Zoonótico	Norte da África	
<i>L. (Leishmania) major</i>	LC	Zoonótico	Ásia Central, norte da África, Oriente Médio, leste da África	
<i>L. (Leishmania) tropica</i>	LC	Antroponótico	Ásia Central, Oriente Médio, partes do norte da África, sudeste da Ásia	
<i>L. (Leishmania) donovani</i>	LC, LV	Antroponótico	África, Ásia Central, sudeste da Ásia	
Leishmania do velho e novo mundo				
<i>L. (Leishmania) infantum</i>	LC, LV	Zoonótico	Europa, norte da África, América central, América do Sul	

Nas Américas, várias espécies de *Leishmania* podem causar leishmaniose tegumentar, tais como: *L. (V.) braziliensis*; *L. (L.) amazonensis*; *L. (V.) guyanensis*; *L. (V.) panamensis*; *L. (L.) mexicana*; e outras(16). Nesta região, a epidemiologia da doença é especialmente complexa com variações intra e interespecíficas nos ciclos de transmissão, reservatórios, vetores, manifestações clínicas e múltiplas espécies de *Leishmania* em circulação em uma mesma área geográfica(10), como pode ser observado na figura 3 - Adaptado de Aronson e cols.(17).

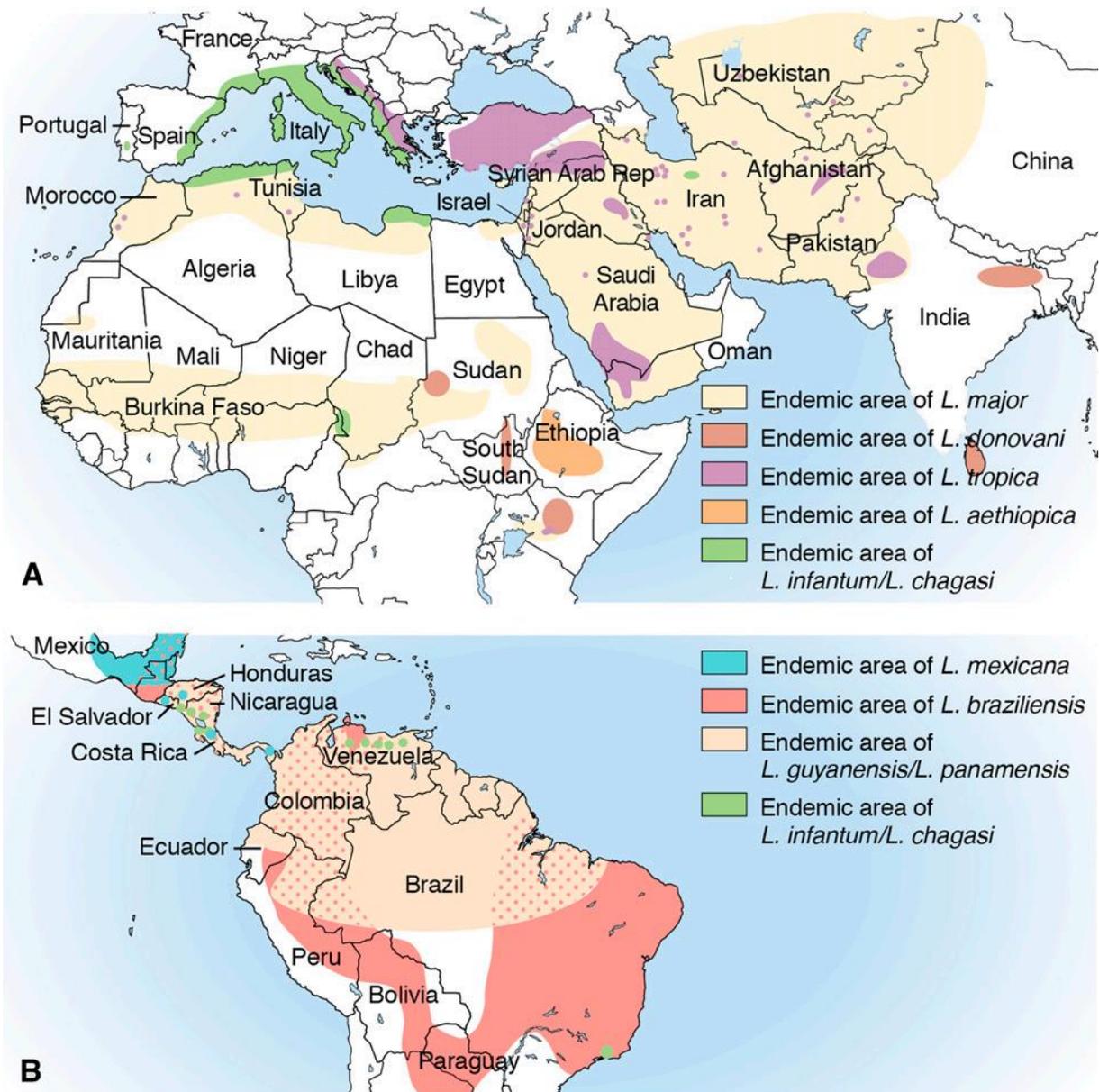


Figura 3 — Mapas da distribuição geográfica da leishmaniose- Fonte - Aronson e cols. 2017(17).

A Leishmaniose tegumentar americana (LTA) se encontra entre as grandes endemias existentes no Brasil e na América Latina(16). Diversos estudos brasileiros apontam a existência da doença e de seu vetor em todas as regiões do Brasil, sendo a doença já registrada em todos os estados brasileiros(18-32). Desde o final do século passado tem-se observado no Brasil a existência de padrões epidemiológicos de LTA. O padrão clássico com adoecimento principalmente de adultos, homens e lavradores ao lado de um outro padrão com o aumento de acometimento de mulheres, de faixas etárias mais homogêneas, de profissões não relacionadas as atividades de mata e procedentes de regiões metropolitanas(33). A figura 4 mostra a densidade de incidência de LTA no Brasil entre 2015 e 2017(34).

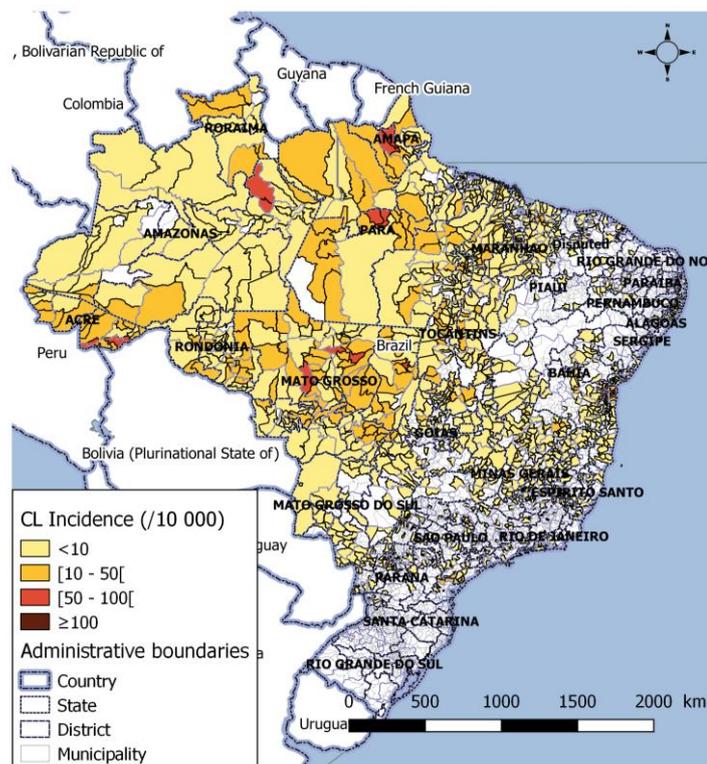


Figura 4 — Casos confirmados de leishmaniose em 2015 - WHO 2017.(Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_CP_disease_distribution_BRA_2015/en/>. Acesso em: 06 nov. 2018.)- Ref: -(34)

Uma forma rara da doença, a LCD representa um enorme desafio no campo da patogênese e da terapêutica(35). As principais espécies associadas com a doença no mundo são a *L. (L.) amazonensis*; *L. (L.) mexicana*; *L. (L.) pifanoi*; e *L.*

(*L.*) *aetiopica*(36), sendo que o maior número de casos surge nas Américas(36) e na Etiópia(37). Entretanto, a LCD tem ocorrido esporadicamente em lugares do mundo nas quais ela tipicamente não ocorre, como: Espanha(38), Sudão(39, 40), Senegal(41, 42), Mali(43) e Índia(44-48).

Nas Américas, as espécies classicamente responsáveis pela LCD são amplamente distribuídas já tendo sido identificadas em países como Estados Unidos(49), México(50), Guatemala(51), Belize(52), República Dominicana(53), El Salvador(54), Honduras(52), Costa Rica(52), Panamá(51), Guiana Francesa(52), Venezuela, Colômbia, Equador, Peru(55), Bolívia(51, 56), Paraguai(54) e no Brasil(57). A LCD, por conseguinte, já foi descrita na Bolívia(56, 58), Colômbia(59), República Dominicana(53, 60, 61), Equador(62), Estados Unidos(63), Guiana Francesa(54), Guatemala(64), Honduras(65), México(50), Nicarágua(66), Panamá(67), Paraguai(54) e Peru(68).

O ciclo de sua principal espécie causadora da doença no Brasil, a *Leishmania (L.) amazonensis*, ocorre em uma ampla região de florestas primárias e secundárias do Brasil, que abrange os estados de Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão, bem como em estados das regiões Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Sul (Paraná). No Brasil, a infecção pela *Leishmania (L.) amazonensis* é muito menos frequente que por outras espécies (aproximadamente 3% dos casos) e isso decorre do seu vetor, *Lutzomyia flaviscutellata*, ser pouco antropofílico e com atividade basicamente noturna(69, 70). Sua importância clínica deriva justamente da grande proporção de infectados que evolui para LCD(70, 71). Além do mais, esta forma de leishmaniose tem ampla distribuição geográfica, já tendo sido relatada em no mínimo 10 estados brasileiros(Figura 5)(57).

O vetor da Leishmaniose cutânea é o flebótomo, sendo que nas Américas várias espécies estão envolvidas, entre elas: *Lu. Intermedia*; *Lu. Gomez*; *Lu. Wellcome*; *Lu. Whitmani*; *Lu. Carrera*; *Lu. Yucumensis*; *Lu. Llanosmartinsi*; *Lu. Spinicrassa*; *Lu. Ovallesi*; *Lu. Rapidoi*; *Lu. Gomez*; *Lu. Ylephiletor*; *Lu. Panamensis*; *Lu. Umbratilis*; *Lu. Whitmani*; *Lu. Anduzei*; *Lu. Longiflocosa*; *Lu. Ayacuchensis*; *Lu. Peruensis*; *Lu. Verrucarum*; e *Lu. Flaviscutellata*(72). Existe uma associação entre a espécie de *Leishmania* e o vetor, e, no caso da *Leishmania (L.) amazonensis*, o *Lutzomyia flaviscutellata* é o vetor associado(73).



Figura 5 — Casos de Leishmaniose difusa relatados até 2005 segundo JML Costa 2009. (Ref: 33)(57)

A Leishmaniose tegumentar americana é uma doença classicamente zoonótica, sendo implicados animais silvestres e o cão doméstico relatado como importante (73). No velho mundo, entretanto, a transmissão antroponótica da LC tem sido descrita(74).

1.3 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A pesar de não existirem critérios homogêneos para o diagnóstico, este deve ser baseado na conjunção de critérios clínico, epidemiológicos e laboratoriais(75). Última versão do Manual do Ministério da Saúde, para efeitos de tratamento, já admite a confirmação do caso por critérios clínico epidemiológicos, quando esta não for possível por métodos clínico laboratoriais(16). Para a definição de casos o mesmo manual coloca os seguintes critérios:

Caso Suspeito

- Leishmaniose cutânea: indivíduo com presença de lesões de pele ulceradas ou não com três semanas ou mais de evolução em paciente residente ou exposto à área de transmissão.
- Leishmaniose mucosa: indivíduo com presença de lesão de mucosa de vias aéreas superiores, principalmente nasal, em paciente residente ou exposto à área de transmissão.

Caso Confirmado

- Critério clínico-laboratorial de Leishmaniose cutânea e/ou mucosa: a confirmação dos casos clinicamente suspeitos deverá preencher no mínimo um dos seguintes critérios:
 - Residência, procedência ou deslocamento em/de/para área com confirmação de transmissão e encontro do parasito nos exames parasitológicos diretos e/ou indireto.
 - Residência, procedência ou deslocamento em/de/para área com confirmação de transmissão e intradermorreação de Montenegro (IDRM) positiva.
 - Residência, procedência ou deslocamento em/de/para área com confirmação de transmissão com outros métodos de diagnóstico positivo.
- Critério clínico-epidemiológico de Leishmaniose cutânea e/ou mucosa
- Todo caso com suspeita clínica, sem acesso a métodos de diagnóstico laboratorial e com residência, procedência ou deslocamento em/de/para área com confirmação de transmissão. Nas formas mucosas, considerar a

presença de cicatrizes cutâneas como critério complementar para confirmação do diagnóstico.

1.3.1 Apresentação clínica

A apresentação clínica é variável podendo resultar em um grande espectro de doenças clínicas(51). A gravidade e apresentação clínica da Leishmaniose depende de muitos fatores, incluindo espécies de *Leishmania* envolvidas, número de parasitos inoculados, local do inóculo e estado nutricional e imunitário do indivíduo(51).

Existem algumas divergências na literatura quanto a classificação das formas clínicas da Leishmaniose, na última edição do Manual de Organização Mundial de Saúde, a Leishmaniose cutânea do novo mundo é dividida em: 1- Leishmaniose Cutânea Localizada; 2- Leishmaniose Mucocutânea; 3- Leishmaniose Cutânea Difusa; 4- Leishmaniose Cutânea Disseminada; e 5- Leishmaniose Cutânea Atípica(76). As formas associadas ao HIV são descritas separadamente(73). Uma forma classicamente descrita no velho mundo é a Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar sendo primariamente causada por *Leishmania (L.) donovani*(73, 77). Apresentação clínica semelhante tem sido descrita também em pacientes infectados com *Leishmania (L.) infantum* com imunodepressão associada a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ou após transplante de órgãos(78-80).

Apresentaremos a seguir as formas clínicas de acordo com a classificação da OMS para pacientes imunocompetentes(73).

1.3.1.1 Leishmaniose Cutânea Localizada-(LC)

É a forma mais comum da doença sendo tipicamente uma úlcera indolor localizada em áreas expostas da pele, com formato arredondado ou ovalado, base eritematosa e com consistência firme, apresenta bordas bem delimitadas e elevadas com fundo avermelhado e granulações grosseiras(Figura 6)(16). Em estudo que incluiu 1.128 pacientes com LC, que foram atendidos em área endêmica para Leishmaniose no Brasil, a área média da lesão foi de 30mm² e com evolução

aproximadamente de 30 dias, embora o tamanho da lesão seja influenciado pelo tempo de evolução(81).

A Linfadenopatia é muito frequente, ocorrendo em 80-100% dos casos(82, 83). Ela pode surgir até 3 meses após o surgimento da úlcera e é dolorosa em 59% dos casos(83). Linfangite, em um quadro semelhante a Esporotricose, também pode ocorrer(7). O paciente típico desta forma é do sexo masculino, agricultor e com uma mediana de 21 anos de idade(81). O teste com o antígeno de Montenegro é positivo em 83-90% dos casos(84-87).

1.3.1.2 Leshmaniose Cutânea Disseminada- (LDS)

É Causada principalmente pela *Leishmania (V.) braziliensis*, mas pode também ser causada pela *Leishmania (L.) Amazonensis*(88), pela *Leishmania (V.) guyanensis* (89) e pela *Leishmania (V.) panamensis*(90). Caracteriza-se pelo aparecimento de 10 ou mais lesões em áreas não contínuas do corpo, podendo ser entre outras papuláres, noduláres, acneiformes ou ulceradas(Figura 7) (91, 92). Sintomas sistêmicos como febre, calafrios e astenia são frequentes, o que sugere uma disseminação hematogênica(93). A reação de Montenegro pode ser positiva ou negativa(93). Apesar de alguns autores referirem que a intradermoreação de Montenegro (IDRM) é fortemente positiva nesta forma da doença(94), sua positividade varia entre 58,8% e 85% em diferentes estudos(92, 95-97) e em um estudo o diâmetro da reação tendeu a ser menor nesta forma que na forma cutânea localizada(98). A reação intradérmica de Montenegro, entretanto, tende a se tornar positiva após o tratamento(92), positividade que chega a 100% em algumas séries de casos(93).



Figura 6 — Úlcera de bordas elevadas típica de Leishmaniose- Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 7 — Leishmaniose disseminada em paciente envolvendo tronco e membros. Fonte- Ref(95)

1.3.1.3 Leishmaniose Mucosa- (LM)

Corresponde entre 1,4 e 16,5% dos casos de LTA a depender do estudo(55, 99-103). Estima-se que 3 a 5% dos casos de LC desenvolvam lesão mucosa(104). No Brasil, a LM é atribuída principalmente à *L. (V.) braziliensis*, mas já foram citados na literatura casos por *L. (L.) amazonenses* e *L. (V.) guyanensis*(104). Pacientes com infecção por *Leishmania (L.) braziliensis* evoluem para a LM com frequência que varia de 0,3 a 16,5%(55, 99-101, 105-107). Ela caracteriza-se por lesões destrutivas na mucosa das vias aéreas superiores de lenta progressão(Figura 8) (104). Os locais mais frequentes de acometimento são o septo e a mucosa nasal(108), mas pode localizar-se nos lábios, boca, faringe, laringe e até vias brônquicas(91, 109-112). Classicamente, nesta forma, a IDRM é positiva em 87-100% dos casos (85, 113) e estudo mais recente mostrou uma sensibilidade de 93,7% para esta forma da doença(114). Alguns estudos também demonstraram que a intensidade da IDRM é maior nos pacientes com LM, quando comparados aqueles com a LC(115-117).

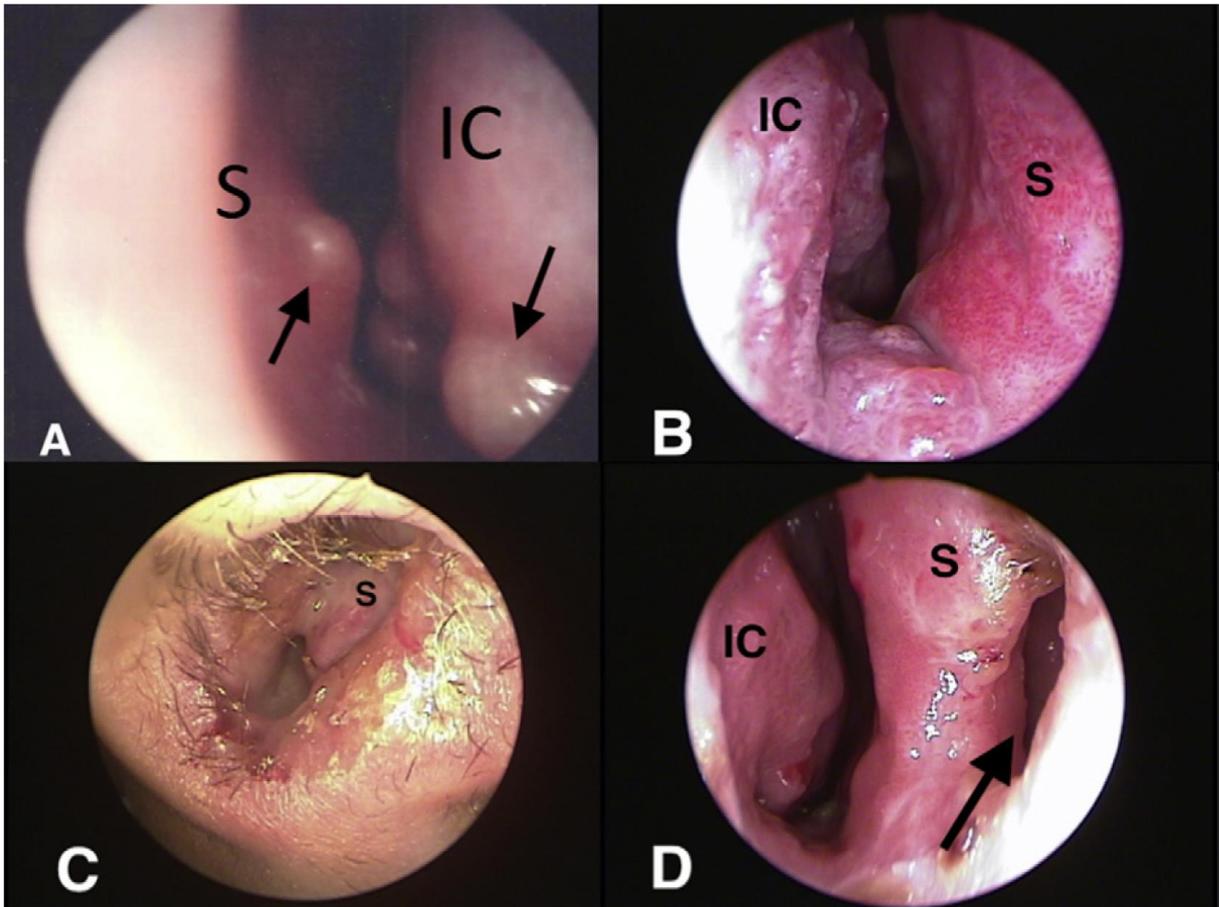


Figura 8 — Aspectos clínicos da Leishmaniose mucosa em diferentes fases da doença segundo Lessa(108) . (A) Lesões nodulares (setas) sem ulceração ao longo da ponta nasal, conchas nasais inferiores e septo (estágio I). (B) Lesões granulares finas, caracterizadas por ulcerações superficiais observadas nas conchas nasais inferiores e o assoalho da fossa nasal (estágio II). (C) Ulcerações profundas com reação tecidual mais intensa e granulação tecidual claramente visível e infiltração da mucosa (estágio III). (D) O septo nasal cartilaginoso é perfurado (seta) com granulação tecidual visível e infiltração da mucosa do septo nasal posterior e conchas nasais inferiores (estágio IV, forma ativa). IC: conchas inferiores; S: septo-Fonte- Ref-(108).

1.3.1.4 Leishmaniose Cutâneo Difusa

Forma rara de Leishmaniose cutânea que ao longo do tempo tem recebido diversas denominações como: Leishmaniose Tegumentar Múltipla, com Lesões Lepromatoides; Leishmaniose Anérgica Hansenoide; Leishmaniose Tegumentar Generalizada, com Lepromas Leishmanióticos; Leishmaniose Disseminada de aspecto Lepromatoso; Leishmaniose Tegumentar simulando Lepra; Leishmaniose

Cutânea Pseudo-Lepromatosa; Leishmaniose Lepromatosa; Leishmaniose Anergó-Histiocitômica Lepromatoide; Leishmaniose Dérmica Não-Ulcerada, em Nódulos e Extensas Placas Infiltradas e Pigmentadas; Leishmaniose Americana Anérgica Disseminada; Leishmaniose Tegumentar Difusa; Leishmaniose Tegumentar Queloidiana; e Leishmaniose Cutânea Difusa(118).

Nas Américas a LCD é causada pela *Leishmania (L.) Amazonensis* e *Leishmania (L.) mexicana*(94), embora já tenham sido reportados casos por outras espécies como: *L. (L.) waltoni*(53), *L. (V.) panamensis*(67) e *L. (V.) braziliensis*(119). A LCD foi inicialmente definida em 1962 por Convit(120), após uma série de casos de Leishmaniose atípica que foram descritos a partir de 1948(56, 121). No trabalho original as seguintes características estão presentes na LCD que permitem sua diferenciação com a LC(120):

1. Ela se inicia com pápulas discretas que crescem lentamente e se desenvolvem em nódulos semelhantes a queloides. Estes nódulos usualmente formam placas que geralmente são lisas, firmes e de cor vermelho amarronzada. Algumas desenvolvem superfície com escama ou verrucosa. Elas não ulceram. A doença pode envolver grandes porções do corpo (Figura 9). As membranas mucosas não são geralmente envolvidas, mas quando atacadas as lesões são somente superficialmente infiltradas e não existem lesões de septo nasal. Os órgãos internos não são lesados.
2. A doença é caracterizada histopatologicamente por granulomas compostos por grandes macrófagos, que contêm leishmanias em grande número em seu citoplasma intensamente vacuolizado.
3. O teste intradérmico com o antígeno de *Leishmania* (Reação de Montenegro) é negativo nos casos iniciais e avançados.
4. Parasitos são abundantes em esfregaços realizados de diferentes lesões.
5. Usualmente a melhora é pequena e apenas temporária com o uso de várias formas de terapia convencional.

Apesar da divergência quanto aos critérios para classificação de um caso como de LCD, a caracterização da lesão clínica como placas e nódulos infiltrados de crescimentos lento, que podem com o tempo atingir grandes áreas da pele, é constante na literatura(118, 122-124). Em estudo brasileiro retrospectivo que

analisou 40 casos de LCD as morfologias mais frequentes em ordem decrescente foram: nódulos em 81%; Placas em 67,6%; tubérculo em 46%; úlceras em 40,6%; vegetação em 19%; e pápulas em 19%(57).

A Leishmaniose difusa também pode levar a acometimento mucoso e este tem frequência aproximada entre um terço e metade dos pacientes a depender do estudo(57, 125, 126). Desde a primeira descrição por Convit em 1959 tem-se assumido que a lesão mucosa na LCD é superficial(125), entretanto, já foram descritos casos de perfuração de septo nasal(57, 127).

Outra manifestação extra cutânea descrita é a lesão óssea(128-130), em um estudo deformidades ósseas ocorreram em 22,5% dos pacientes, sendo estas principalmente em extremidades(57). As lesões ósseas na LCD são caracterizadas por encurtamento das falanges, principalmente as distais, por uma redução do espaço articular levando a deformidades nas extremidades limitando o movimento articular e levando a prejuízo nas atividades da vida diária(128, 131). Em modelo animal ficou caracterizada a relação direta entre a *L. (L.) amazonensis* e as lesões ósseas, na forma de uma osteomielite crônica(132). Estudos radiográficos e cintilográficos das lesões ósseas tem importante papel na identificação, localização, seguimento e abordagem para biópsia destas lesões(131).

A LCD caracteristicamente não leva a acometimento visceral(133). Por outro lado, a visceralização já foi descrita em pacientes com imunossupressão secundária a câncer(50), linfopenia(134) e em pacientes HIV positivos(46). Estes pacientes com condições imunossupressoras eventualmente desenvolvem quadros de Leishmaniose que muitos autores classificam como LCD, apresentando a combinação de lesões cutâneas não ulceradas e histopatológico compatível com a entidade(38, 41, 43, 46, 135-137). Entretanto, além da descrição de acometimento visceral, em alguns destes casos a LCD esteve associada a espécies de *Leishmania* não classicamente associadas a esta apresentação clínica, como *L. (L.) major*(43, 134) e *L.(L.) infantum*(38, 58).

A negatividade da IDRM também é uma constante nos estudos, tipicamente em 100% dos pacientes(85, 115). Em série de casos em que 30 pacientes foram submetidos a IDRM, esta foi negativa em 90% dos casos(27 pacientes), houve alternância entre positivo e negativo em 6,6%(2 casos) e o teste foi falso positivo em um caso(57).



Figura 9 — Placas, nódulos e pápulas não ulceradas em paciente com Leishmaniose difusa. Fonte: Ref(138)

1.3.2 Diagnóstico Laboratorial

1.3.2.1 Reação intradérmica de Montenegro (IDRM)

Foi primeiramente descrita por Wagener em 1923, sendo introduzida por Montenegro em 1926 para o diagnóstico de Leishmaniose(6, 139, 140). O teste consiste na aplicação de 0,1ml do antígeno intradermicamente na região flexora do antebraço, sendo a leitura feita 48 horas depois, uma endureção de 5mm ou mais considerada positiva(Figura 10) (16, 141). Ela mede a reação de hipersensibilidade

retardada a uma injeção intradérmica de uma suspensão de promastigotas mortas(142). No Brasil, a época de realização do estudo, o antígeno de Montenegro era produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos(CPPI)(143).

O uso da IDRM se baseia no fato de que a fisiopatologia da LC e LM caracterizam-se por uma resposta imune Th1 com positividade da hipersensibilidade do tipo retardada, bem como proliferação linfocitária, e produção de IFN- γ e TNF- α após estimulação antigênica(144, 145). Apesar de, na LC causada por *Leishmania (V.) braziliensis*, quase a totalidade dos pacientes apresentarem produção *in vitro* de IFN- γ (146), testes que procuram avaliar a produção de IFN- γ na Leishmaniose ainda não foram capazes de substituir a IDRM. Teste *in vitro* de produção de interferon gama desenvolvido para ser utilizado em condições de campo (QUANTIFERON) foi positivo em apenas metade dos indivíduos que tinham positividade a IDRM(147). De forma semelhante, em outro estudo com contatos domiciliares de pacientes, 38,9% dos indivíduos que apresentavam IDRM positiva não produziam IFN- γ quando estimulados *in vitro*(148). Este teste, entretanto, quando associado à IDRM foi útil em aumentar a estimativa de indivíduos expostos a *Leishmania* entre contatos de 11,7% para 17% (148).

Por ser consequência da relação parasito/hospedeiro, a IDRM apresentará diferenças macro e microestruturais a depender da resposta imune gerada, sendo que desde sua descrição a reação local ao antígeno já foram descritos casos em que se apresentou eritematosa, como pápula, vesícula ou pústula(6, 141). Estudo histopatológico do local de aplicação do antígeno de Montenegro mostraram que pacientes com LTA apresentam maior quantidade de leucócitos na reação, mas uma menor proporção de linfócitos T que os controles(149). Em estudo semelhante Guarin e colaboradores mostraram diferenças no infiltrado inflamatório local entre indivíduos hígidos que não tiveram contato com a *Leishmania*, indivíduos com lesão aguda (evolução menor que 1 mês), indivíduos com lesões crônicas (evolução maior que 6 meses) e indivíduos com infecção assintomática(150). Pacientes com reação de Montenegro positiva mais que não desenvolveram a doença apresentaram infiltrado com relação positiva entre macrófagos e linfócitos T CD8+, já pacientes com infecções crônicas mostraram associação entre células T CD4+ e T CD8+(150). Em outro estudo, a reação no local de aplicação do antígeno de

Montenegro de pacientes com Leishmaniose mucosa tinha menos células de Langerhans que de pacientes com Leishmaniose cutânea(116).

A IDRMM é utilizada principalmente para diagnóstico(16). Contudo, a sensibilidade deste teste é bastante variável na literatura. Na maior parte dos estudos entre 89-98% dos doentes tem o teste positivo(87, 151-154). Entretanto, em estudo realizado em área de *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*, apenas 77% dos doentes apresentaram positividade na IDRMM(155). Outro fator importante é a duração de doença, sendo que em um estudo o teste foi positivo em 78% dos pacientes com até duas semanas de doença, mas em 98% dos pacientes com mais de quatro semanas(156). Resultados semelhantes foram obtidos em outro estudo no qual a IDRMM teve sensibilidade de 75% para lesões agudas e de 93,3% para lesões crônicas, a especificidade, entretanto, foi semelhante entre os grupos(157).

Outra limitação do teste é sua positividade em pacientes sadios de áreas endêmicas que varia de 6,3% e 17,9% (26, 158-160), sendo que alguns autores consideram que a maior parte destes pacientes com IDRMM positiva e sem evidência de LTA no passado ou no presente, teve uma infecção subclínica(148, 160, 161). Existem também estudos que sugerem que o teste poderia, por si só, causar uma reação imune suficiente para a positividade do teste em uma segunda aplicação(162, 163). Em estudos longitudinais em áreas endêmicas, entretanto, esta positividade da IDRMM é mais comumente atribuída a infecção subclínica entre as aplicações(160).

Positividade do teste na ausência de exposição a *Leishmania* é um assunto ainda controverso. Poderia ser explicada por reação cruzada com outras doenças sendo que estudos antigos mostraram, que alguns pacientes com Pênfigo Foliáceo ou Tuberculose apresentam IDRMM positiva(164), porém posteriormente outro estudo sugeriu que a IDRMM não se torna positiva em indivíduos sem exposição(165), sendo negativa em doentes com tuberculose(166). A relação com a BCG também é controversa sendo que estudo com animais mostrou que a vacinação com BCG pode induzir reação cutânea ao antígeno de *Leishmania*(167), mas estudos em humanos sugeriram, que a vacinação prévia com o BCG pode inibir a IDRMM(168, 169). A doença de chagas é citada com uma das possíveis causas de reações cruzadas pela literatura(7), mas estudo mostrou que 95,1% dos pacientes com doença de chagas tem a IDRMM negativa, sendo que o autor sugere que a IDRMM

poderia ser utilizada para discriminar infecções por *Leishmania* ou *T. cruzi* em áreas nas quais os dois parasitos estão presentes(170). Em estudo no Rio de Janeiro grande proporção de pacientes com Esporotricose tiveram IDRM positiva sendo que reações cruzadas ou coinfeções podem explicar parte dos casos(171). Outra possibilidade é a ocorrência de reações ao diluente presente no teste(7, 172).



Figura 10 — Intradermoreação de Montenegro: após a aplicação intradérmica de um solução contendo preparação antigênica de formas promastigotas de *Leishmania*. O resultado deve ser avaliado dentro de 48 horas, com uma caneta esferográfica, é positivo caso se forme uma pápula maior ou igual a 5mm. Fonte- Ref (7)

Testes sorológicos

Existem diversos testes sorológicos para o diagnóstico de Leishmaniose cutânea entre eles a imunofluorescência indireta (IFI), Western blot, aglutinação direta, hemaglutinação indireta, teste de difusão em gel, variações do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) entre outros(7, 173). Entretanto, estes testes podem ter, em algumas situações, interpretação problemática, principalmente quando seus títulos encontram-se próximos aos pontos de corte(16).

A imunofluorescência indireta (IFI) tem uma sensibilidade que varia de 47-79%(87, 174-177). O teste, entretanto, tem importante variação a depender de fatores como o antígeno utilizado e da espécie de *Leishmania* mais importante na população estudada. Em estudo brasileiro, a sensibilidade deste teste foi de 80,2% quando utilizado o antígeno de *Leishmania (V.) braziliensis* e de apenas 54,3% quando utilizado o antígeno de *Leishmania (L.) amazonensis*(178). Houve tendência de maior sensibilidade em casos relacionados a *Leishmania (V.) braziliensis* quando comparados aos causados por *Leishmania (V.) guyanensis* em outro estudo(179). Em estudo do velho mundo, a positividade em pacientes com Leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (L.) major* foi de apenas 47%(174). Na população de pacientes com IDRM positiva e lesão ativa, entretanto, a positividade chega a 90%(180). Uma restrição do teste é a reação cruzada principalmente com a doença de Chagas e o Calazar, que também ocorrem em áreas endêmicas para LTA(181, 182), sendo que em estudo epidemiológico a presença de IFI positiva com IDRM negativa é atribuída à Doença de Chagas(183).

É sugerido na literatura que os títulos de anticorpos poderiam ser utilizados para monitorar o tratamento(184). A negatificação da IFI foi associada a cura da lesão, quando a avaliação foi realizada em período de até 120 dias após o tratamento, e pacientes que continuam a apresentar títulos de anticorpos estão sob risco de evoluir para doença crônica e reaparecimento de lesões cutâneas e/ou mucosas(177). Isso é reforçado por diferentes estudos que mostraram diminuição dos títulos de anticorpos e a negatificação da IFI em grande proporção dos pacientes ao longo do tempo(176, 177, 185). Outras técnicas baseadas na resposta humoral à *Leishmania* também estão em estudo. Uma técnica promissora utiliza a citometria de

fluxo para a detecção de anticorpos contra as formas amastigotas de *Leishmania (V.) brasiliensis*(186).

O ELISA teve desempenho semelhante a IFI em um estudo sendo positivo em 88,9% dos doentes quando utilizado o antígeno de *Leishmania (V.) brasiliensis* (178). Em outro estudo realizado no Paraná-Brasil o teste teve alta acurácia com sensibilidade de 93% e especificidade de 94,8%(187). O Imunoblot mostrou-se um método de grande sensibilidade (96,6%) e possibilita a identificação e exclusão de proteínas responsáveis por reações cruzadas(178). Por sua vez o Western Blot é um teste promissor com sensibilidade de 100% em estudo preliminar. Entretanto, este é um teste caro e que demanda estrutura laboratorial mais robusta(7, 174).

A aglutinação direta, por outro lado, é um teste simples de ser realizado e de baixo custo(188). Este teve sensibilidade de 90,5% e especificidade de 91,8% em área endêmica para Leishmaniose causada por *Leishmania (L.) aetiopica* com a utilização de antígeno homólogo(188). Além disso, neste estudo, todos os 4 pacientes com LCD foram sororeagentes, e com títulos muito altos (em média ≥ 8192)(188). O autor discute que de forma semelhante a Leishmaniose visceral, a LCD caracteriza-se por altos títulos de anticorpos(188). Altos títulos de anticorpos também foram encontrados pelo mesmo método em pacientes estudados por Mengistu(189, 190).

Exame direto

Existem variações na técnica, sendo que pelo Manual do Ministério da Saúde são opções para a coleta do material para o exame direto as seguintes: escarificação do bordo da lesão; biópsia com impressão do fragmento cutâneo em lâmina por aposição e punção aspirativa(16). Ainda existe, entretanto, muita discussão na literatura de qual o método traria maior acurácia ao exame(7). A punção aspirativa se mostrou mais sensível que a raspagem da lesão em um estudo iraniano(191). Um novo método utilizando uma broca dentária foi semelhante a punção aspirativa e melhor que os demais métodos testados em outro estudo(192). Quando ao local de coleta de amostra, o centro da lesão foi mais sensível que da periferia(193). Em estudo brasileiro o esfregaço por pressão de fragmento de tecido

da borda da lesão teve sensibilidade de 85,3% na LC, sendo um método simples e de baixo custo(Figura 11)(194).

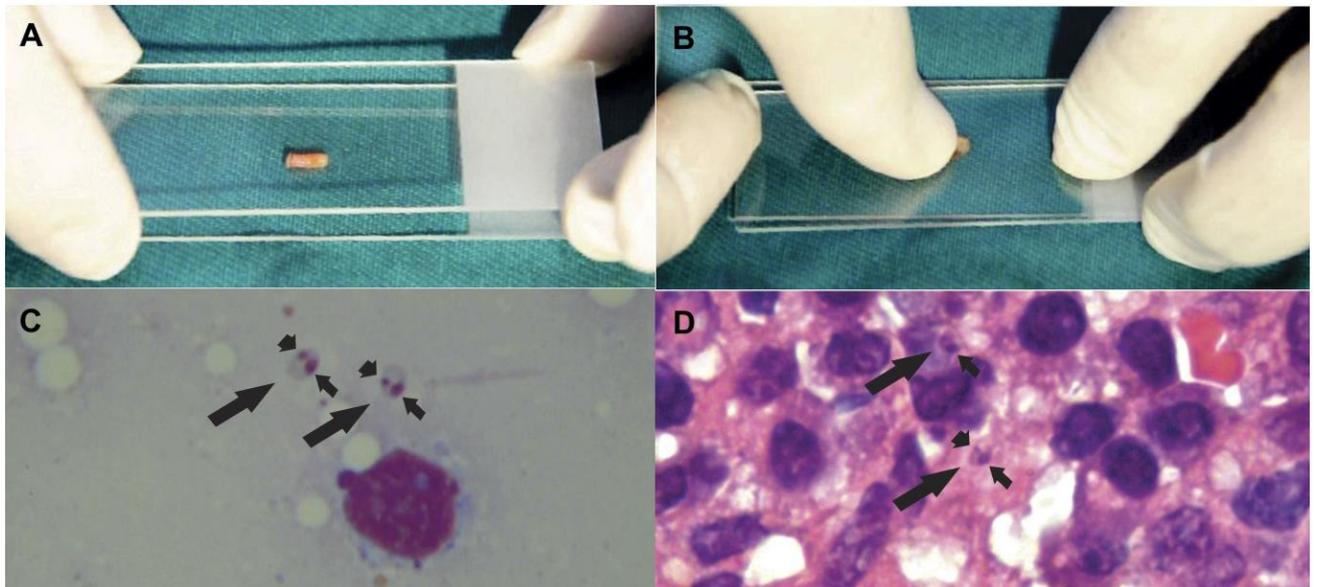


Figura 11 — A e B- Coleta do esfregaço por pressão de fragmento de lesão de acordo com Sousa e col. C- Esfregaço obtido por este método mostrando duas formas amastigotas de *Leishmania* spp.(setas longas), com núcleos (setas curtas) e cinetoplastos (ponta de seta); 4- Formas amastigotas em cortes histológicos (setas longas), com núcleos (seta curta) em uma observa-se cinetoplasto(ponta de seta).

Em lesões mucosas, dependendo do local acometido, a coleta pode ser feita com raspagem com uso de bisturi, escova de citologia e lavagem(195). Após a coleta de 1 a 3 lâminas o material será fixado com metanol e observado em microscópio ótico com a utilização de colorações como Giemsa, Leishman ou corantes rápidos(16).

A sensibilidade do teste de acordo com diferentes estudos está entre 48%-89% a depender a população estudada e da técnica utilizada(87, 191, 196). O desempenho do teste, entretanto, tende a variar bastante com a forma e tempo de evolução da doença sendo pior nas formas crônicas hiperérgicas(7). Apesar de ser uma forma crônica, na LCD o exame direto tende a ser positivo(188). Exames parasitológicos (cultura/esfregaço) foram capazes de identificar 100% com esta forma em um estudo(188).

Cultura

O Ministério da Saúde na última edição de seu Manual coloca que podem ser realizadas culturas em meios de cultivo e através da inoculação em animais, sendo esta última forma pouco utilizada(16). No mesmo Manual está preconizado o cultivo com coleta a partir de biópsia ou com tubo selado a vácuo com o meio de cultura. Os meios preconizados são Neal, Novy e Nicolle (NNN) ou “Liver Infusion Triptose” (LIT)(16). Existem, entretanto, diversas variações nas técnicas de coleta e de cultivo(7).

A sensibilidade do método varia entre 37% a 67,5% utilizando os métodos de coleta e cultivo tradicionais (87, 197-199). Estudo com microcultura em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1.640 contendo 20% de Soro Bovino Fetal (FBS) mostrou que este teve uma sensibilidade de 84,7% e já o meio convencional NNN teve sensibilidade de 59,3%(198). A cultura do fragmento de biópsia também tendeu a ter menor positividade que a cultura do aspirado(200). Em outro estudo que incluiu pacientes com linfadenopatia, a aspiração linfonodal foi positiva em 58,6% dos doentes, já a aspiração da lesão foi positiva em apenas 34,5%, e a combinação dos dois métodos, entretanto, chegou a uma sensibilidade de 79,3%(82). Na LCD a cultura tem alta positividade, sendo que em estudo retrospectivo em pacientes brasileiros ela foi positiva em 100% dos casos(57).

Técnicas moleculares

Técnicas de biologia molecular são promissoras, mas não são disponíveis na grande maioria dos centros de referência(7). A técnica mais conhecida é a reação em cadeia da polimerase(PCR), entretanto, existem variações na coleta e realização do exame. A coleta pode ser feita, por exemplo, a partir de diversos materiais biológicos: fragmento da lesão, fragmento da lesão após cultura, imprints de fragmento de lesão, material colhido raspagem da lesão, de lâminas utilizadas para exame direto, de papel filtro e de blocos de parafina(199, 201-204). Além de variação na técnica utilizada também existe variação nos iniciadores utilizados durante a amplificação do material genético do parasito(205).

Apesar da variação, a sensibilidade dos melhores métodos é alta estando entre 90% e 100% para a LC(7, 199, 202). Para a LM, a revisão sistemática mostrou grande variabilidade entre os estudos com sensibilidade variando de 35% a 100%, sendo que, a metanálise com combinação dos estudos mostrou sensibilidade de 76% para esta forma de doença(206).

Outro método de biologia molecular em estudo é o NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification). Em estudo preliminar esta técnica demonstrou sensibilidade de 97,5% em fragmentos de biópsia de casos de LC(207). A grande vantagem do método é que ele detecta fragmentos de RNA podendo ser potencialmente relacionada a viabilidade do patógeno(207). O método tem, portanto, potencial aplicação na avaliação de resposta ao tratamento. Nesta linha, estudo utilizando o método de maneira quantitativa, mostrou que um QT-NASBA positivo após 6 semanas de tratamento esteve relacionado a falha de tratamento/atraso no tratamento ao final de 6 meses(208).

Histopatologia

Na LTA causada por *L. (L.) brasiliensis*, classicamente descreve cinco padrões histopatológicos, assim como definido por Magalhães e colaboradores, estes são: I- Reação exsudativa celular; II- Reação exsudativa e necrótica; III- Reação exsudativa e necrótica granulomatosa; IV- reação exsudativa e granulomatosa e V- Reação exsudativa e tuberculoide(209)(Tabela 2). Outro estudo no velho mundo classificou os casos de forma cutânea em quatro tipos: Tipo 1 (45% dos casos)- Com predominância de macrófagos e presença de alguns polimorfonucleares e linfócitos, estando presente quantidade considerável de amastigotas; Tipo 2 (27,5%)- Mistura de macrófagos, polimorfonucleares e plasmócitos associado a necrose; Tipo 3 (15%)- Formação inicial de granuloma com células epiteliais, linfócitos e alguns plasmócitos; Tipo 4 (5%)- granuloma epitelióide bem formado na derme com células gigantes tipo Langerhans, linfócitos e células epitelióides(210). A forma disseminada da doença tende a apresentar o mesmo padrão histopatológico da LC, entretanto, o parasito circulante parece ter preferência pelo folículo piloso o que faz com que habitualmente exista um infiltrado perifolicular nesta forma da doença(93).

Quadro 2 — Padrões histopatológicos da Leishmaniose tegumentar.

Grupo	Denominação	Características principais
I	Reação exsudativa celular	Infiltrado histiolinfoplasmocitário com proporções celulares que tendem a equivalência
II	Reação exsudativa e necrótica	Necrose tissular de amplitude e forma variáveis, associada à vasculite aguda, no seio do infiltrado linfohistioplasmocitário
III	Reação exsudativa e necrótica granulomatosa	Reação granulomatosa desorganizada nas proximidades da área de necrose tissular, com vasculite aguda menos frequente, no seio do infiltrado linfohistioplasmocitário
IV	Reação exsudativa e granulomatosa	Reação granulomatosa desorganizada isolada no seio do infiltrado linfohistioplasmocitário
V	Reação exsudativa e tuberculoide	Reação granulomatosa epitelióide organizada no seio do infiltrado linfohistioplasmocitário

Adaptado de Magalhães 1986(209).

Entretanto, os achados histopatológicos tendem a ser algo diferentes a depender a forma de Leishmaniose. Sangueza propõe classificação histopatológica da Leishmaniose tegumentar em primária (cutânea) e secundária (mucocutânea). Segundo esta classificação a forma mucocutânea poderia ser dividida em: 1- forma edematosa; 2- forma granulomatosa proliferativa; e 3- forma granulomatosa necrotizante(211, 212). Na forma edematosa inicial existe atrofia epitelial, com infiltrado inflamatório superficial e profundo de linfócitos, plasmócitos e macrófagos sendo possível observar poucos microrganismos dentro dos macrófagos. Segue-se então uma fase granulomatosa proliferativa com o surgimento de hiperplasia pseudoepiteliomatosa e granulomas epitelióides, que agora acompanham o infiltrado misto. Na fase final associa-se necrose do colágeno caracterizando o padrão granulomatoso proliferativo(211, 213). Choi e colaboradores procuraram sintetizar os diferentes padrões histológico encontrados em cada forma da doença(Tabela 3)(214).

Quadro 3 — Achados Histopatológicos segundo a forma clínica. Adaptados de Choi e cols 2002(214).

Forma	Achados epidérmicos	Achados dérmicos	Presença de organismos na lesão	Organização do infiltrado
LC	Hiperqueratose, paraqueratose, plugs foliculares necrose, Degeneração de células basais, raros parasitas nas células epidérmicas	Linfócitos + histiócitos, plasmócitos ocasionais, raros eosinófilos e neutrófilos	Abundantes em lesões iniciais, poucos ou ausentes em tardias	Difuso
LCD	Ausência de necrose	Macrófagos cheios de formas amastigotas predominam, muitos organismos livres, mínima reação celular	Abundantes	Difuso
LR	Atrofia, plugs foliculares, hiperqueratose e paraqueratose, Ausência de necrose	Células de gigantes de Langhan, Granulomas constituídos de células epitelioides	Poucos ou ausentes	Granulomas bem organizados
PKDL	Número diminuído de grânulos de pigmento nas máculas hipopigmentadas	Semelhante a LR mais com tecido fibroso perivascular	Poucos ou ausentes	Granulomas bem organizados
LM	Atrofia e necrose	Plasmócitos abundantes, apesar de pouca infiltração.	Poucos ou ausentes	Difuso
LV	Melanina aumentada na camada basal, atividade megaloblástica aumentada	Leishmania em macrófagos ao redor de glândulas sudoríparas, folículos pilosos e vasos sanguíneos.	Podem estar presentes na pele, linfonodos, baço, medula óssea e sangue (raramente)	Difuso
LC: Leishmaniose cutânea localizada, LCD: Leishmaniose cutânea difusa; LR: Leishmaniose recidiva cútis, PKDL: Leishmaniose Dérmica pós-calazar; LM: Leishmaniose mucosa; LV: Leishmaniose visceral.				

Os padrões histológicos da LTA também foram avaliados por um grupo brasileiro(215), que depois foi modificado para se aplicar tanto ao novo como ao

velho mundo(216). Este autor classificava a resposta inflamatória como celular (C), fibrinoide (F) ou mista (M) sendo esta associada ao grau de resposta histológica da seguinte forma: 1- Não-reativa, 2- reativa, 3- Infiltrativa, 4- Tuberculoide e 5- Hipersensitiva. Posteriormente, Ridley propôs modificação desta classificação sendo os padrões histopatológicos divididos em seis: A- Resposta macrofágica intacta; B- Necrose difusa; C- Necrose focal; D- Tuberculoide reativo e E- Lupoide. Além disso, é analisada a resposta dos macrófagos, está podendo ser: A- macrofágica anérgica, B-Intermediária e C- Tuberculoide(217). Segundo Hassan e colaboradores, o padrão histológico A é semelhante ao encontrado na LCD (descrito a seguir) e pode ser encontrado na LC causada por *L. (L.) Tropica* e por *L. (L.) Major*, mas geralmente este padrão é transitório na doença causada por estas espécies e além disso as manifestações e o curso clínicos são diferentes do que ocorre na LCD(218).

Na LCD é descrito o padrão macrofágico(219), que nos casos avaliados Ridley inicialmente seriam classificados como Celular não responsivo-CI. No Brasil, Brito a classificou como “Leishmaniose Anérgica Hansenioide” em um padrão distinto das outras formas de LTA. Este padrão é assim descrito pelo autor “Substituição das estruturas dérmicas por densa proliferação histiocitária, com histiócitos exibindo acentuada vacuolização e repletos de parasitos. As clássicas imagens em “clareiras” e, ainda, aspectos em “anel de degrau” dos elementos histiocitários parasitados são claramente observados. Células Plasmáticas sempre abundantes, havendo áreas francamente sifiloides. O infiltrado ora toca a epiderme ora está separado por uma facha “Grenz” de espessura variável. Linfócitos são, em geral, pouco frequentes exceto em um dos casos em que a célula apresenta-se em número apreciável na derme profunda(220).

De acordo com Bittiencourt o padrão macrofágico presente na LCD é descrito como o achado monótono de macrófagos abarrotados por Leishmanias podendo estar associado a uma faixa de tecido não infiltrado, logo abaixo da epiderme (Faixa de Unna)(221). Segundo a mesma referência é frequente o achado de atrofia epidérmica e a presença de faixa de tecido conjuntivo não infiltrado (faixa de Unna) logo abaixo a epiderme. Os macrófagos vacuolados diminuem a medida que se aproximam dos planos profundos da pele, embora permaneçam parasitados(221).

Com relação a infiltração linfocitária, na LCD ela é geralmente mínima(222), podendo se tornar discreta a moderada na profundidade da lesão, segundo

Bittencourt. (Figura 12)(221). Não são encontradas, entretanto, células gigantes multinucleadas e nem células epitelioides(221) nesta forma da doença.

Barral e colaboradores descreveram três casos de LTA por eles descritos como LCD subpolar que seriam diferenciados da LCD polar por apresentarem necrose citolítica e redução do número de parasitas intracelulares(Figura 13)(122). De acordo com estes autores a intensidade do infiltrado linfoplasmocitário, a presença de faixa de Unna, a presença de eosinófilos e a acantose não apresentavam distribuição espectral(122). Posteriormente, uma das autoras do mesmo grupo passou a descrever o padrão de LCD dimorfa, que se diferenciaria histopatologicamente da forma subpolar por apresentar reação granulomatosa, definida, como a presença de granulomas epitelioides ou células gigantes multinucleadas(221). O padrão histológico da LC causada por *L. (L.) amazonensis* com IDRМ negativa pode ser semelhante ao encontrado na LCD, sendo a única diferença microscópica observada a presença de necrose maciça dos macrófagos parasitados(223).

Entretanto, segundo Bittencourt é sempre importante correlacionar os achados histopatológicos com os achados clínicos e imunológicos, para diferenciar as formas polar, subpolar e dimorfa da LCD(221).

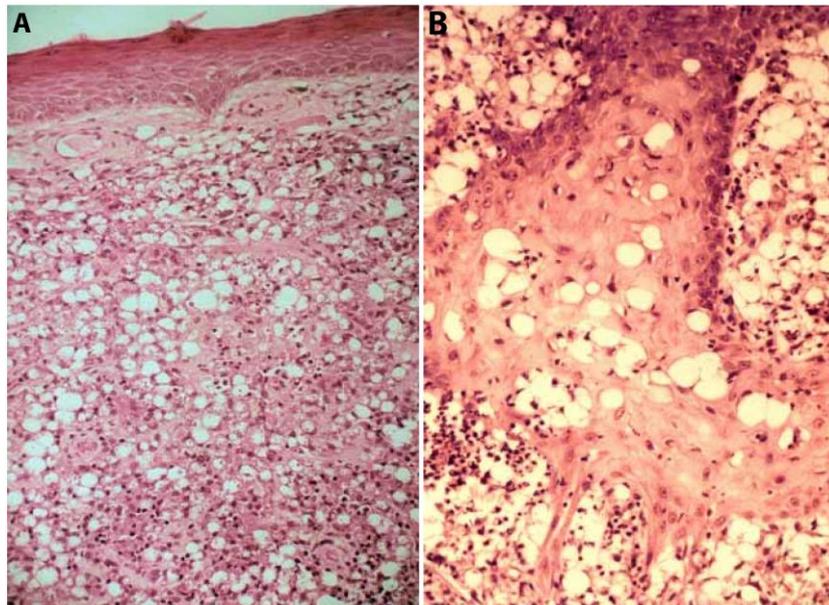


Figura 12 — Caso de LCD polar segundo Bittercourt- A: Atrófia epidérmica, Faixa de Unna e difusa Infiltração de macrófagos vacuolados e parasitados. Profundamente a discreto infiltrado mononuclear (HE, aumento original 100); B- LCD Polar. Epiderme com acantose invadida por macrófagos parasitados. Há destruição da camada basal

da epiderme e aspecto macrofágico na derme (HE, Aumento original 125). Fonte: Bittencourt(221).

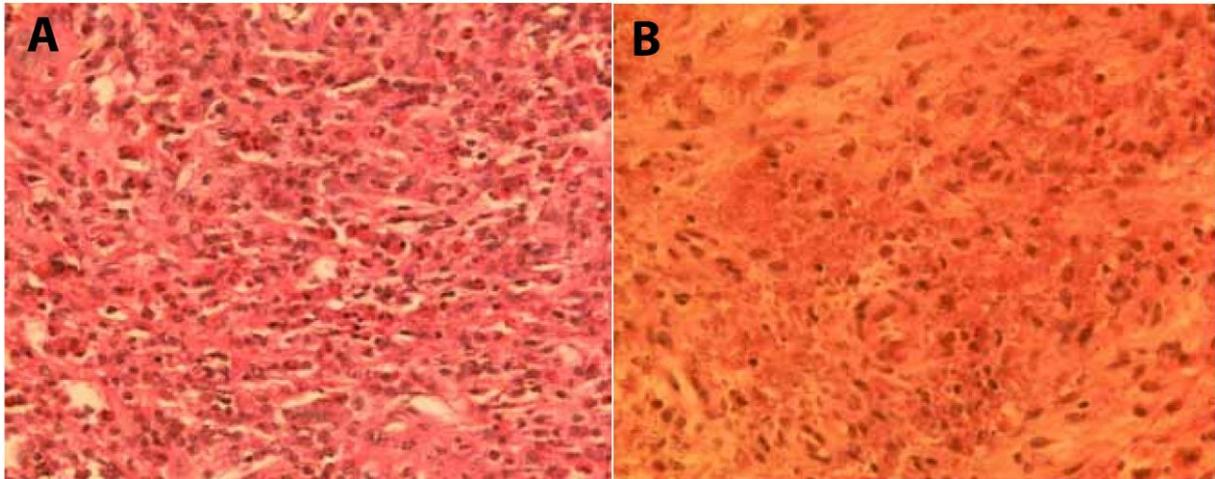


Figura 13 — Caso de LCD subpolar segundo Bittercourt- A- Presença de vários eosinófilos (HE, Aumento original 125); Presença de múltiplas áreas de necrose citolítica (HE, Aumento original 250). Fonte- Bittencourt(221).

1.4 IMUNOPATOLOGIA DA LEISHMANIOSE

Os linfócitos T tem papel central em orquestrar a resposta imune de mamíferos(224). A compreensão de como esta resposta se processa, entretanto, sofreu grandes transformações ao longo do tempo(224). Até a década de 1970 predominava o conceito que as células T poderiam ser divididas segundo seus marcadores de superfície(224). Entretanto, a partir de 1973 vários trabalhos mostraram que existiria uma relação inversa entre a resposta imune humoral, representada pela produção de anticorpos; e a celular, representada principalmente pela reação de hipersensibilidade retardada(224, 225). Posteriormente, estas respostas foram associadas a diferentes tipos de linfócitos T baseado no padrão de produção de citocinas e sendo estas diferentes respostas chamadas de Th1 e Th2(224, 226, 227).

De acordo este paradigma clássico, na Leishmaniose cutânea o desenvolvimento de doença estaria ligado a resposta imune Th2 e a cura a resposta Th1(228), embora esta relação nunca fosse tão estabelecida como no caso da

Leishmaniose visceral(229). Neste contexto, formas de difícil tratamento como a LCD, eram atribuídas a uma resposta imune Th2 com grande produção de IL-4, IL-5 e IL-10(230). A imunopatologia da LTA, entretanto, é bastante complexa, e formas severas causadas por espécies do subgênero *Viannia* são caracterizadas por um quadro de hiperimunidade mista Th1/Th2 (231, 232).

A Leishmaniose mucosa, por exemplo, é caracterizada por uma alta produção de interferon gama(IFN- γ) e fator de necrose tumoral Alfa (TNF- α), mas também de IL-4 e IL-5(144, 233). Análise por citometria de fluxo comparando pacientes com LC e LM mostrou, que células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes que desenvolveram a forma mucosa expressam mais frequentemente receptores para IL-2 e para IFN- γ . Análise por imuno-histoquímica de fragmentos de lesões mostrou, que apesar de existir diminuição de TNF- α , IFN- γ e IL-4 após o tratamento(234), a persistência de TNF- α em lesões cicatrizadas pode indicar que um pano de fundo inflamatório persiste, o que poderia oferecer um substrato para a recorrência da Leishmaniose mucosa(235). Uma implicação importante achada está no fato de que a pentoxifilina, um potente inibidor do TNF- α , é eficaz como coadjuvante no tratamento da LM e reduziu os níveis de TNF- α na mucosa após o tratamento(236).

A imunopatogênese da LDS também tem disso alvo de investigação. Estudo mostrou, que após estímulo com o antígeno de *Leishmania* existiria uma menor produção de IFN- γ e TNF- α por PBMC de pacientes com esta forma da doença, quando comparados com pacientes com LC(91, 237). A resposta imune tissular foi estudada por imuno-histoquímica com marcadores para CCL2, CCL3, CCL11, CXCL10, IFN- γ , TNF- α , IL-10 e TGF- β e não se mostrou diferente entre os pacientes com a LDS e aqueles com a LC(95). Foi, entretanto, observada diferença na resposta sistêmica, sendo que PBMC de pacientes com a forma disseminada produziam mais CXCL9 quando estimuladas com o antígeno de *Leishmania*(92, 95). A CXCL9 é uma quimiocina induzida pelo IFN- γ que está associada ao recrutamento e proliferação de linfócitos T(92). O autor explica os achados argumentando, que a CXCL9 estaria recrutando células pró-inflamatórias local da lesão causando então dano tecidual(95).

Das formas de Leishmaniose tegumentar, a que apresenta de maneira mais distinta do ponto de vista imunopatológico é a Leishmaniose difusa. A resposta

imune celular está afetada, com negatividade da intradermoreação de Montenegro, ao contrário do que ocorre nas outras formas onde é positiva(88). Utilizando-se o paradigma clássico, o IFN- γ , clássica citocina Th1 está diminuído durante a fase ativa da doença, enquanto citocinas Th2, como IL-2, IL-4 e IL-10, estão aumentadas(88). Entretanto, os mecanismos que levam a esta disfunção da resposta imune celular na Leishmaniose difusa ainda são pouco compreendidos.

A pesar do avanço no entendimento da importância das alterações imunes efetoras e reguladoras, quando a doença está plenamente desenvolvida, pouco se sabe quais são as causas básicas destas alterações, o estudo da resposta imune inata tem-se mostrado promissor neste aspecto. Estudo com camundongos mostrou que Leishmanias infectados com Leishmania virus-1 (LRV1) são reconhecidos pelo receptor Toll-like 3 (TLR3) do hospedeiro induzindo a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias com aumento de lesão clínica e, paradoxalmente, de carga parasitária(238). O dsRNA do LRV1 se liga especificamente ao TLR3 com produção de IFN- β no início da infecção modulando a resposta imune inicial de uma forma que favorece a sobrevivência parasitária(239). A importância do IFN- β na patogênese do LRV1 associado a Leishmaniose também foi sugerida em outro estudo(240).

Desta forma tem ganhado evidência no entendimento da fisiopatogênese da Leishmaniose outros sinais, que não somente a avaliação através do paradigma clássico Th1/Th2. Estes levam em conta tanto outros fenótipos de LT como os linfócitos T regulatórios e Th17, como também o papel dos macrófagos e de diferentes vias co-estimulatórias/co-inibitórias como será explicado a frente. Neste aspecto recente, a revisão da literatura apresenta o balanço de sinais regulatórios versus inflamatórios provenientes de macrófagos como importantes na patogênese das diferentes formas da doença(Figura 14)(241).

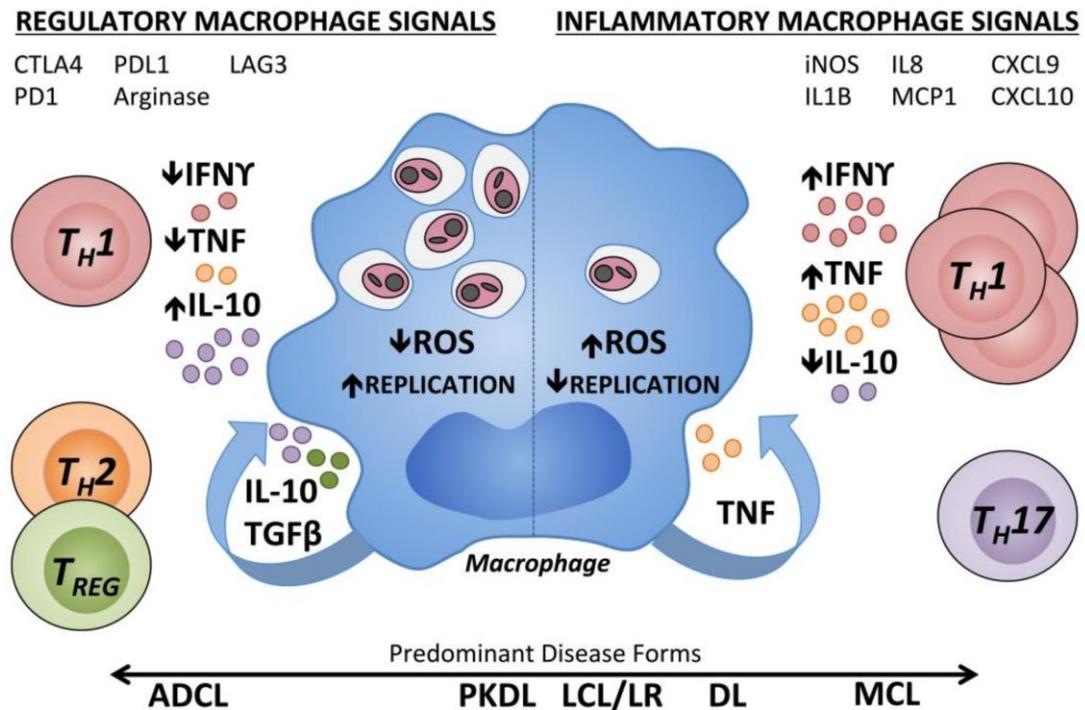


Figura 14 — Papel dos macrófagos nos diferentes estados patogênicos durante a infecção por *Leishmania*. Os macrófagos humanos parasitados por *Leishmania* spp. são sujeitos a regulação por citocinas presentes na pele e no local da infecção. Citocinas inflamatórias do tipo 1, IFN- γ e TNF- α , podem sinergicamente induzir a produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos, levando a inibição da replicação de *Leishmania* dentro do fagolisossomo. LT Th17 estão aumentados no infiltrado inflamatório da LM. Mediadores quimioatrativos (IL-8, MCP-1, CXCL9 e CXCL10) e mediadores associados com a ativação clássica (Tipo 1) de macrófagos (iNOS, IL-1 β) tem sido descritos em lesões inflamatórias de LC. No ambiente imunorregulatório (a esquerda), existem baixos níveis de citocinas tipo 1 e ausência de efetores microbicidas. Mediadores derivados de LT ou de macrófagos incluindo citocinas do tipo 1, IL10 e TGF- β antagonizam os efeitos de IFN- γ e TNF e podem resultar em proliferação parasitária. Receptores inibitórios em células CD8+ e CD4+ (PD-1, CTLA-4, LAG3) e seus contra ligantes (CD80, CD86, CD-L1) são associados a exaustão de LT. **IFN- γ** : interferon gama, **TNF- α** : Fator de necrose tumoral alfa; **IL-10**: interleucina 10, **TGF- β** : Fator de transformação do crescimento beta; **ROS**: Espécies reativas de oxigênio; **ACDL**: Leishmaniose cutânea difusa; **PKDL**: Leishmaniose dérmica pós calazar; **LCL**: Leishmaniose cutânea localizada; **LR**: Leishmaniose residivans cútis; **DL**: Leishmaniose disseminada; **MCL**: Leishmaniose mucocutânea; **DHT**: Hipersensibilidade retardada do tipo 1; **Th**: Células T auxiliares; **MCP**: Proteína quimiotática de monócitos; **CXCL**: ligante e quimiocina CXC; **CTLA-4**: Antígeno 4 do linfócito T citotóxico; **PD-1**: proteína de morte programada 1; **LAG3**: gene de ativação de linfócito 3; **PD-L1**: Ligante 1 de morte programada. Adaptado de Scorza e cols. 2017(241).

1.5 COESTIMULAÇÃO E COINIBIÇÃO E A VIA PD-1/PD-L1

O conceito de coestimulação surgiu a partir do modelo de dois sinais para a ativação de linfócitos T virgens, e foi inicialmente pensado para explicar a diferenciação entre antígenos próprios e não próprios(242). Neste modelo, a célula apresentadora de antígeno (APC) entregaria dois sinais ao linfócito T (Figura 15). O primeiro sinal seria a ligação do complexo MHC+antígeno que se ligaria ao receptor de célula T (TCR) e o segundo seria um sinal coestimulatório entregue pelas APCs a algum receptor presente nas células T(243). Caso somente o primeiro sinal fosse recebido, a célula T ou se tornaria apoptótica ou anérgica sendo incapaz de proliferar ou produzir IL-2 a estímulos posteriores com o mesmo antígeno(244, 245). Posteriormente foram também descobertos sinais coinibitórios que seriam fisiologicamente importantes e que sua ausência provocava síndromes autoimunes em modelos animais(246-249).

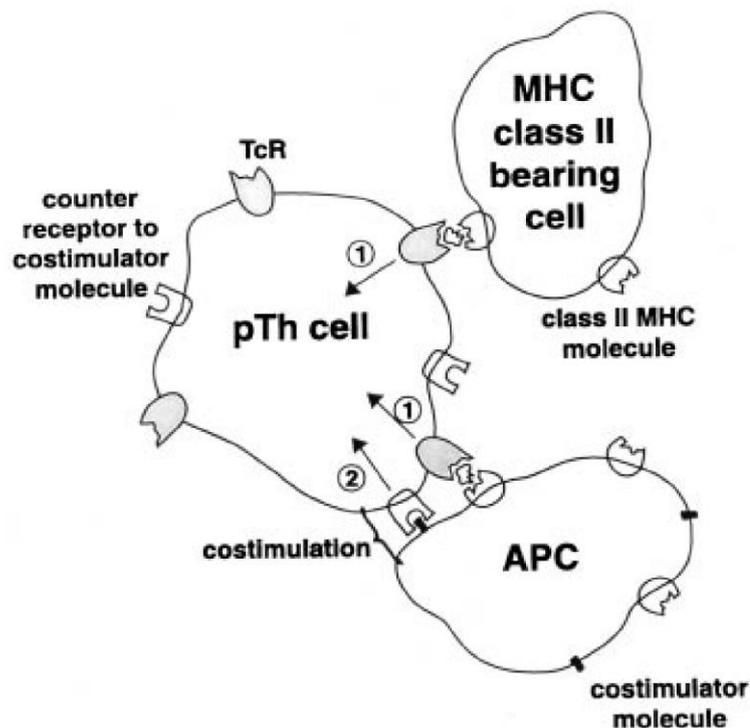


Figura 15 — Modelo de ativação de célula T. A ligação do sinal um apenas resulta em inativação, enquanto a ativação requer tanto o sinal 1 como o sinal 2. Adaptado de Bretcher e cols.(243).

O modelo mais bem estudado de co-inibição/co-estimulação é o que envolve CTLA-4 e CD28 nos linfócitos T e CD80 e CD86 nas APC (Figura 16)(245). Durante a apresentação de antígenos o sinal coestimulatório é dado pelo CD80 ou CD86 expresso pelas APCs. Caso ocorra ligação destas moléculas com o CD28 expresso na superfície de linfócitos T tanto virgens como ativados ocorrerá então um sinal coestimulatório positivo e com proliferação e sobrevivência linfocitária. Por outro lado, se ocorrer ligação com o CTLA4 presente na superfície de linfócitos ativados, ocorrerá inibição da resposta imunitária (Figura 17) (250). Enquanto a expressão de CD28 constitucional nas células T, a expressão de CTLA4 é transitória, sendo esta molécula rapidamente internalizada(251).

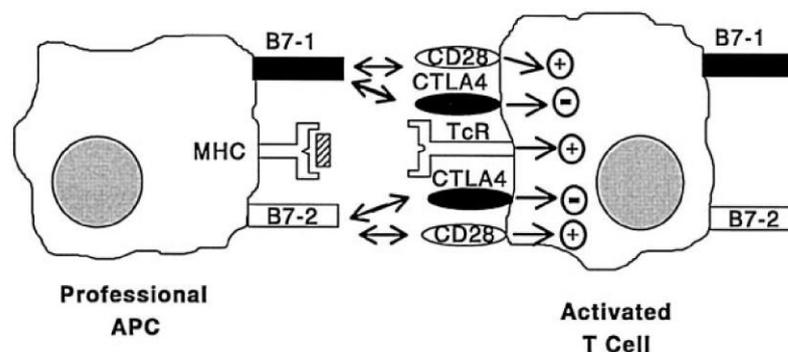


Figura 16 — Modelo simplificado da coestimulação mediada pela via B7:CD28/CTLA-4. Para completa ativação, os LT requerem pelo menos dois sinais da célula apresentadora de antígenos (APC). O sinal 1 e antígeno específico e é enviado LT por meio do receptor de célula T (TcR) pela ligação deste ao complexo antígeno + MHC II. O sinal co-estimulatório, ou sinal 2, é enviado principalmente por B7-1(CD80) e B7-2(CD86) na célula apresentadora de antígeno e é essencial para a proliferação de LT, para a produção de linfocinas e para a sobrevivência celular. Ligação do CD28, expresso em células T virgens e T ativadas aos CD80 ou CD86 nas células apresentadoras de antígenos (APC) resulta em sinal co-estimulatório positivo. Em contraste, a ligação ao CTLA-4, expresso em células T ativadas, pelas mesmas moléculas resulta em resposta negativa ou coinibitória. Adaptado de Karandikar 1998(250).

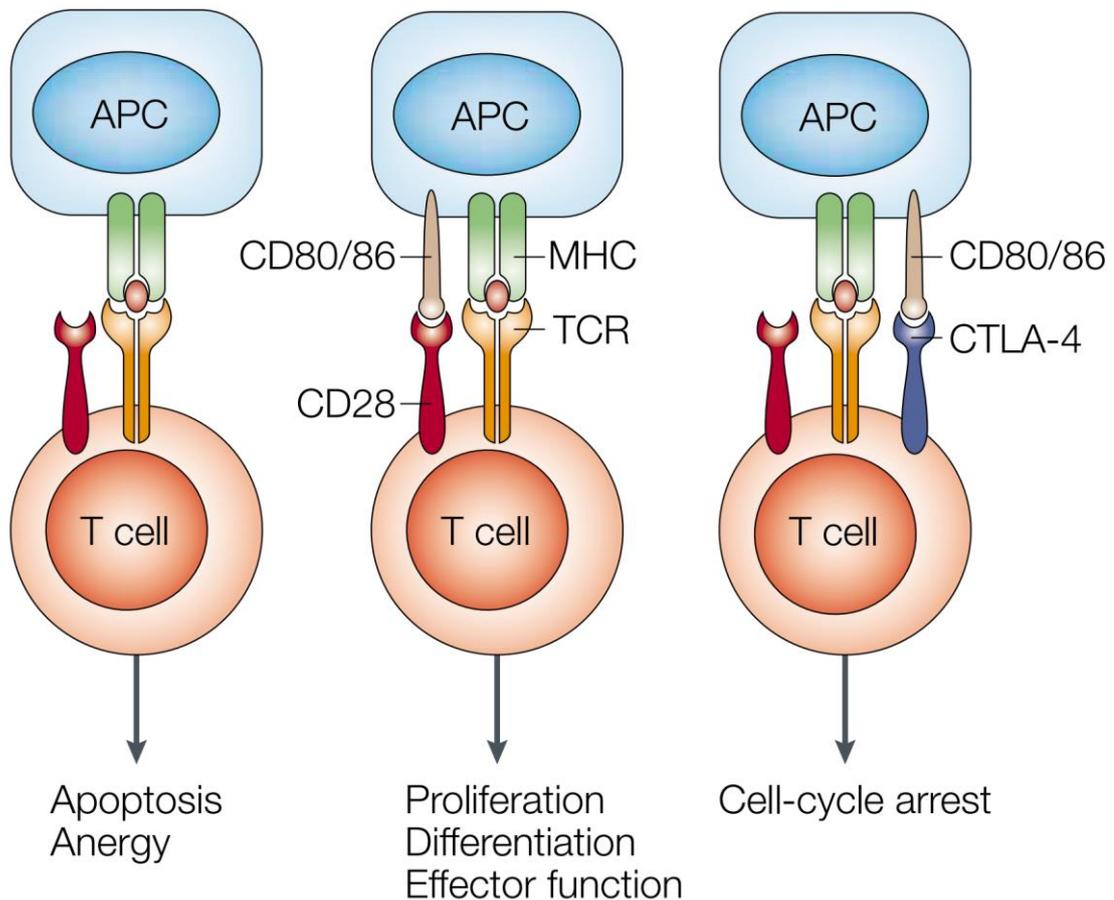
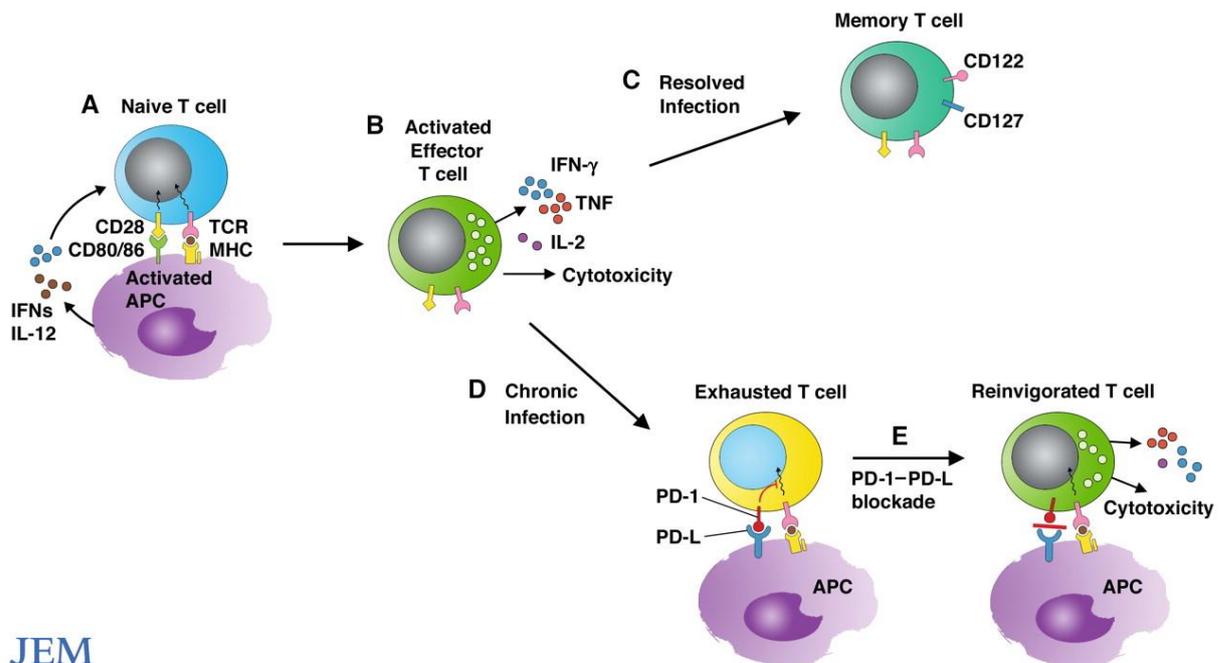


Figura 17 — Destino do LT após diferentes estímulos do TCL- Reconhecimento simultâneo do complexo MHC-peptídeo pelo receptor de célula TCR e B7-1(CD80) ou B7-2(CD86) pelo receptor co-estimulatório CD28 resulta na ativação de célula T. Na ausência da ligação de CD28, o LT se torna apoptótico ou fica anérgico. Após a ativação do LT e aumento da expressão de CTLA-4 (ou CD152), coligação TCR e CTLA-4 resulta em parada do ciclo celular e fim da ativação do LT. Adaptado de Alegre 2001(245).

Posteriormente, foi descoberto um novo receptor inibitório presente na superfície das células T, o PD-1, sendo que ele e seus ligantes (PD-L) também classificados na superfamília B7-CD28 (Figura 18)(252). Inicialmente a PD-1 foi incriminada como possível causa de apoptose(253). Contudo, posteriormente se demonstrou que a expressão de PD-1 não era requerida na via comum de apoptose(254) e que sua ausência em diferentes modelos animais foi associada alterações autoimunes como miocardite(249, 255) e diabetes do tipo 1(256). Em paralelo, foi descoberto o PD-L1 estaria associada a regulação negativa de respostas imunes com a produção de IL-10 na presença de baixas quantidades de

IL-2. Sua expressão também estava aumentada em tecidos protegidos de ação imunitária exacerbada como a placenta e os pulmões(257). Posteriormente foi identificado um segundo ligante, o PD-L2, que, ao se ligar ao PD-1 é capaz de inibir a proliferação e a produção de citocinas por linfócitos(258).



JEM

Figura 18 — Durante a apresentação de antígenos pelo MHC a célula apresentadora de antígeno pode entregar um segundo sinal estimulatório, no exemplo CD80/CD86. Este sinal provocará a diferenciação do linfócito T virgem em uma célula efetora com proliferação linfocitária, aumento de citotoxicidade e de citocinas como IFN- γ . Em algumas situações como infecções crônicas, as células apresentadoras podem levar a produção de um segundo sinal inibitório, no caso o PD-1. A presença deste sinal pode então levar a diminuição das funções citotóxicas, da proliferação e da produção de citocinas pelos linfócitos. Adaptado de Freeman e cols. 2006(259).

O PD-1 e seus ligantes parecem ser fundamentais em várias condições fisiológicas e patológicas como: condições autoimunes(248, 260-262), resposta antitumoral(263, 264), no transplante(265, 266) e na resposta a doenças infecciosas (267-271).

Alterações na via PD-1/PD-L estão associadas ao desenvolvimento de autoimunidade. Em camundongos de diferentes linhagens, Nishimura e colaboradores mostraram camundongos com deleção de um PD-1 eram predispostos manifestações lúpus-like, sendo que a manifestação específica

dependeria da do background genético e poderia variar de glomerulonefrite e artrite até cardite com trombose maciça letal, nos casos de deleção de ambas as cópias do gene(248). Mesmo grupo posteriormente mostrou que camundongos BALB/c com deleção de ambos os genes de PD-1 desenvolviam cardiomiopatia dilatada, entretanto, que esta não ocorria em modelo animal incapaz de produzir linfócitos maduros (deficientes de RAG2)(249, 272), o que sugeriu o caráter autoimune da manifestação. Em modelo de camundongo pré-diabético não obeso, os dois ligantes de PD-1 tiveram funções diferentes. Neste modelo, PD-L1 mas não de PD-L2 é expresso nas ilhotas pancreáticas, e o bloqueio de PD-L1 mas não de PD-L2 leva a o desenvolvimento de diabetes mellitus(260). Em humanos, estudo também mostrou que mutação no gene do PD-1 é mais frequente em sujeitos afetados com Lúpus eritematoso sistêmico (SLE) que na população hígida(262).

A expressão de mRNA de PD-L1 e PD-L2 está aumentada em uma variedade de linhagens tumorais(258), sendo que desde a fase de estudos in vitro era apontada como possível alvo para intervenções terapêuticas antitumorais(273). Em estudo com células de mastocitomas em camundongos, Iwai e colaboradores mostraram que linfócitos T CD8+ apresentavam menor citotoxicidade e produção de IFN- γ contra tumores que expressavam PD-L1 que os que não expressavam este ligante. Esta redução de funções efetoras foi quase completamente revertida com o uso de anticorpo monoclonal anti-PD-L1. A aplicação do anticorpo monoclonal foi capaz de retardar o crescimento de mielomas em camundongos BALB/c e este tumor não se desenvolveu em camundongos que não expressavam o gene de PD-1. Por outro lado a linhagem de melanoma de camundongos, B16, que não expressa PD-L1, se desenvolveu da mesma forma em camundongos PD-1(-/-) e em (+/+) (264). Estudos em humanos mostraram que, uma variedade de tumores como renais(274), esofágicos(275), gástricos(276), ovarianos(277), uroteliais(278), pancreáticos(279) e melanomas(280) expressam PD-L1 e que, sua expressão se relaciona ao prognóstico(274-280). Entretanto, a expressão de PD-L1 não é apenas um marcador prognóstico sendo que estudos tem mostrado a eficácia de bloqueadores da via PD-1/PD-L1 no tratamento de melanoma(281-283), carcinoma não pequenas células do pulmão(284, 285), carcinoma de células renais(286, 287) e casos refratários de linfoma de Hodgkin(288).

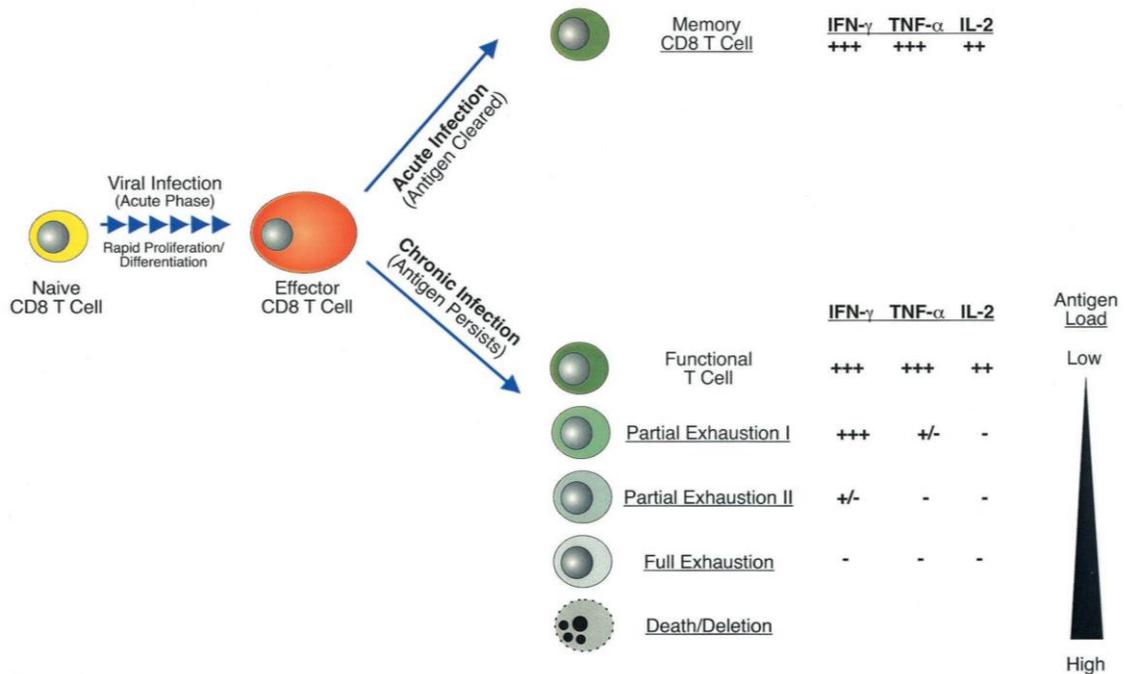


Figura 19 — Modelo de perda hierarquica de função de LT durante infecção viral crônica. Linfócitos T de memória persistem na ausência de antígenos após uma infecção aguda e são completamente funcionais e capazes de síntese imediata de IFN- γ , TNF- α e IL-2 após reencontro com o antígeno (parte superior da figura). Persistência viral resulta em disfunção de LT CD8+ em vários estágios (parte inferior da figura). LT funcionais pode coexistir com o vírus se o encontro com o antígeno for infrequente. Exaustão parcial “I” representa um estágio em qual a expressão de IL-2 e TNF- α está comprometida, mas é mantida a expressão de IFN- γ . Exaustão parcial “II” representa um estágio em que a produção de IFN- γ também se torna comprometida. Neste momento algumas células produtoras de IFN- γ ainda podem ser detectadas, mais muitas estão exaustas. Completa exaustão é a perda total das funções efectoras incluindo a produção de IL-2, TNF- α e IFN- γ . Finalmente, deleção de LT CD8+ epitopo específico pode ocorrer se a apresentação do epitopo aos LT for alta ou sustentada. Esta perda hierarquica da função é dramaticamente influenciada pelo antígeno, sendo que na presença de baixos níveis do vírus, LT mantém a capacidade funcional, mas a medida aumenta a carga viral, funções efectoras são perdidas progressivamente. Finalmente, um alta carga antigênica leva deleção de LT antígeno específicos. Adaptado de Wherry 2003 e cols.(289).

A função da via PD-1/PD-L durante o transplante, entretanto, tem sido controversa sendo que em modelo murino sua atividade teve papel inibitório nas alorespostas e que a inibição desta via por diferentes mecanismos (bloqueadores ou transfusão de linfócitos de camundongos PD-1^{-/-}) teve papel pró-inflamatório principalmente as custas de IFN- γ (290). Por outro lado, em camundongos submetidos a transplante ortotópico de córnea, foi demonstrado que o aumento da

expressão de PD-L1 nas células endoteliais da córnea e sua ligação ao PD-1 teve papel importante na sobrevivência do enxerto(265, 266). Da mesma forma, em modelo de transplante cardíaco, o uso da proteína de fusão PD-L1.Fc em camundongos CD28 -/- ou WT tratados ciclosporina promoveu a sobrevivência de aloenxertos cardíacos(291).

No contexto de doenças infecciosas a expressão de PD-1 foi associada ao desenvolvimento de exaustão de linfócitos T em resposta a agentes patogênicos como HIV (292), *Leishmania (L.) donovani* (271) e *Plasmodium* sp(293). A exaustão de LT é definida como uma diminuição das funções efectoras, expressão sustentada de receptores inibitórios e um estado transcricional que é diferente do que ocorre em LT efetores ou de memória, sendo possível que represente um estado distinto da diferenciação de células T(294). O processo se dá de forma gradual com diminuição de citocinas efectoras como IFN- γ , TNF- α , IL-2 além de perda do potencial citotóxico e proliferativo em LT CD8+(Figura 19). Isso seria associado a expressão progressiva de receptores inibitórios como PD-1, LAG-3, CD244, CD160 entre outros(294, 295). Esse caráter progressivo é diferente do que ocorre na anergia de LT, a qual ocorre após a primeira exposição ao antígeno e se desenvolve rapidamente(294). Em recente revisão da literatura Wherry e Kurachi resumem as principais diferenças entre anergia e exaustão de LT(Tabela 4) (296).

Quadro 4 — Comparação entre Exaustão e anergia.

Característica	Exaustão	Anergia
Causa principal	Estimulação excessiva e contínua	Estimulação subótima
Natureza e cronologia	Hiperestimulação do sinal 1 e sinal 3 levam a perda progressiva da função efetora e de memória (Tipicamente em algumas semanas)	Quanto sinais 2 e/ou 3 são ou ausentes ou fracos durante o “priming”, a disfunção de LT ocorre durante um período inicial (Tipicamente em alguns dias)
Capacidade proliferativa	Baixa	Baixa
Expressão de marcadores inibitórios	Alto (e múltiplos marcadores são expressos)	?
Função efetora	Baixa a moderada	Nenhuma ou baixa
Sensibilizadas propriamente	Sim	Não

Adaptado de Wherry 2015(296).

A fisiopatologia da LTA também pode envolver a exaustão celular mediada pela via PD-1/PD-L. Mou e colaboradores mostraram, que camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) major* deficiente em arginase desenvolviam uma forma crônica da infecção caracterizada por diminuição da proliferação ao antígeno de *Leishmania* e da produção de IFN- γ e este estado vinha associado a expressão de PD-1 em LT CD4+(297). Em outro estudo camundongos BALB/c imunizados com LPG de *L. (L.) mexicana* ou infectados com diferentes cargas parasitárias de *L. (L.) mexicana* foi avaliada a expressão de PD-1 e PD-L2 *ex vivo* e *in vitro*, após estimulação com o LPG. Neste modelo, vacinação com concentrações crescentes de LPG ou com maior número de parasitas foi associado a maior expressão de PD-1 e disfunção de LT CD8+. A reestimulação com LPG foi capaz de aumentar a expressão de PD-L2 em macrófagos e PD-1 em LT CD8+ de maneira dose dependente(298). Em outro estudo células CD8+ de pacientes com LTA ativa mostraram maior frequência de linfócitos T CD8+ expressando os receptores inibitórios CD160, CTLA4, PD-1 e TIM-3 quando comparados a controles saudáveis. Entretanto, quando comparado ao grupo de pacientes com LTA curada, LT CD8+ de pacientes com LTA ativa tinham apenas a expressão de CD160 aumentada(299).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO:

1. Após realizar estimulação *in vitro* com SLA de células mononucleares de sangue periférico de sujeito com LCD, avaliar a expressão de PD-L1 em monócitos e associar esta expressão a positividade para IFN- γ e Granzima B em linfócitos.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS:

2. Avaliar a expressão de marcadores *ex vivo* de marcadores possivelmente envolvidos na patogênese da LDC: em monócitos (CD14, CD40, CD44, CD80, PDL1, HLA-DR e CD86) e em linfócitos (CD44, CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO e CD40) em células mononucleares de paciente com LCD.
3. Após realizar estimulação *in vitro* com SLA de células mononucleares de sangue periférico de sujeito com LCD, avaliar *in vitro* após estimulação com o antígeno solúvel de *Leishmania* a expressão de marcadores possivelmente envolvidos na patogênese da LCD; em monócitos (CD14, CD40, CD80, CD44, CD86, HLA-DR) e Linfócitos (CD40, CD44, CD4, CD8, CD45RA, CD25, CD44).
4. Realizar revisão narrativa da literatura de forma a correlacionar os achados do estudo aos já descritos por outros trabalhos.

3 MÉTODOS

3.1 DIAGNÓSTICO DO SUJEITO

Os procedimentos para coleta de material para Diagnóstico do sujeito foram realizados no Serviço de dermatologia do Hospital Universitário de Brasília-UnB. Após a apresentação inicial as amostras do aspirado da lesão em dorso nasal foram inoculadas no meio McNeal, Novy & Nicolle (NNN) e foi realizado esfregaço por imprint dos fragmentos de pele. Foi realizada biópsia de pele para exame histopatológico e coloração para Hematoxilina e Eosina e Imunofluorescência indireta (IFI) de sangue periférico utilizando o antígeno de Leishmania. Foi realizada reação intradérmica de Montenegro (IDRM) com a aplicação do intradérmica de 0,1ml do antígeno de Montenegro (CPPI/Piraraquara-Paraná-Brasil-2015) e mensuração da endureção 48h após.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE DE LEISHMANIA

O DNA total das culturas foi purificado para análise molecular pelas técnicas de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) ITS1 e de Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) utilizando a enzima de restrição HaeIII. Os procedimentos foram realizados como de costume no Laboratório de Dermatômica da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília-UnB.

A PCR-RFLP que utilizou a enzima HaeIII foi realizada da seguinte maneira: os tubos foram previamente identificados e incubados em banho Maria a 37° (máximo de variação de 2°C). Foram adicionados 5µL de amostra em seus respectivos tubos, e em seguida, adicionado 5µL de mix (10 unidades da enzima HaeIII, 10µL de tampão 10X e 39 µL de água ultrapura, suficientes para 10 amostras). As amostras permaneceram incubadas por 1 hora e em seguida submetidas à corrida eletroforética. A PCR-RFLP que utilizou a enzima BstUI foi realizada da seguinte maneira: os tubos foram previamente identificados e incubados em banho Maria a 60° (máximo de variação de 2°C). Foram adicionados 10µL de amostra em seus respectivos tubos, e em seguida, adicionado 10µL de mix (0,3 unidades da enzima BstUI, 10µL de tampão 1X e 77 µL de água ultrapura,

suficientes para 10 amostras). Estas amostras também permaneceram incubadas por 1 hora e em seguida submetidas à corrida eletroforética

O sujeito ainda foi acompanhado com os exames laboratoriais que fazem parte da rotina de manejo de pacientes com LTA no Hospital Universitário de Brasília.

3.3 ANÁLISE EX-VIVO E REESTIMULAÇÃO IN-VITRO DE PBMC

O sangue periférico foi coletado após 11 meses de tratamento (14 meses após o surgimento da lesão) e, ao tempo da coleta, o sujeito estava apenas em uso de Alopurinol (1200mg/dia). O sangue periférico foi coletado após 11 meses de tratamento e, ao tempo da coleta, o sujeito estava apenas em uso de Alopurinol (1200mg/dia). As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram obtidas por purificação por gradiente utilizando o Ficoll e foram analisadas *ex vivo* e *in vitro* após 48 horas. Nos experimentos as células foram marcadas com fluorocromos associados a anticorpos para analisar moléculas de superfície [CD14, CD40, CD44, CD80, ligante da proteína de morte celular programada 1 (PD-L1), HLA-DR, CD86, CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD45RA, e CD25]. Para o experimento *in vitro*, parte das células foi reestimulada com o antígeno solúvel de *Leishmania (L.) amazonensis* por 48hs, uma outra parte foi mantida em cultura por 48hs (controle negativo) e uma terceira foi estimulada com a concanavalina A(ConA) por 48hs (controle positivo). A viabilidade celular foi verificada utilizando a marcação de Anexina V e pelo marcador nuclear fluorescente Iodeto de Propídio (PI) e as células foram então avaliadas por citometria de fluxo (Verse/BD Biosciences, San Jose, CA, USA), e analisadas pelo software FlowJo (FlowJo, USA). Para avaliar a produção de moléculas intracelulares (IFN- γ and granzima B), a Brelfedina A foi adicionada 4 horas antes da marcação e análise por citometria de fluxo de forma a interromper a secreção de proteínas intracelulares. Os procedimentos foram realizados como descrito detalhadamente a seguir.

3.3.1 Separação das células mononucleares de sangue periférico por gradiente de Ficoll

O sangue periférico foi coletado utilizando-se escalpe e foi colocado em tubo heparinizado no dia 07 de novembro de 2016 no Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília às 13h (HUB-UnB) e foi levado ao Laboratório de Biologia Molecular-UnB, Departamento de Biologia Celular, IB-UnB, aonde foi conservado em temperatura ambiente para a separação no dia seguinte às 8h.

O 20ml de sangue total foi colocado em um tubo Falcon 50ml e foi então realizado a separação de células mononucleares de sangue total de acordo com o método. Segue passo a passo:

1. Foi adicionado ao tubo Falcon com sangue, 15ml de Tampão fosfato salino (PBS) não diluído e estéril chegando ao volume final de 35ml e foi realizada homogeneização.
2. Foram coletados 12ml de Ficoll plaque Plus® 1,077g/ml (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) com o auxílio de uma seringa de 10ml.
3. O Ficoll foi colocado no fundo de outro tubo Falcon 50ml deixando-o escorrer pela parede do tubo.
4. A Inversão do tubo contendo Ficoll foi realizada delicadamente para evitar bolhas.
5. O tubo com Ficoll foi inclinado delicadamente para que fique próximo a boca do tubo.
6. O tubo com sangue encaixado ao tubo com Ficoll.
7. O tubo com sangue foi inclinado delicadamente e devagar, para que o sangue entre no tubo com Ficoll e fique sobre o Ficoll, de forma a não misturar as fases. O volume total neste momento é de 47ml.
8. O tubo foi centrifugado a temperatura ambiente (25 °C) a 400xG por 30min Aceleração(ACC)= 5 e Desaceleração (DEC)= 0.
9. Após centrifugação foi possível observar quatro fases do tubo: 1- Plasma, 2- fase branca, Ficoll e hemácias, no fundo do tubo.
10. Foi colocado 50ml de PBS estéril em um novo tubo Falcon de 50ml para adicionar os leucócitos.

11. O plasma foi retirado com uma pipeta de 10ml e pipetador, sem suspender a fase seguinte.
12. Com a mesma pipeta de 10ml foi retirada a fase branca (leucócitos) e esta foi transferida para o novo tubo Falcon anteriormente preparado e foram adicionados 40 a 50ml de PBS 1X para completar do volume do tubo.
13. As células foram colocadas no gelo (4°C).
14. O tubo com as células foi centrifugado a 400xg por 10min a 4°C, com aceleração (ACC)=9 e desaceleração(DEC)=9.
15. O tubo foi invertido para descartarmos o sobrenadante.
16. Os leucócitos foram lavados mais duas vezes com PBS 1X 5ml.
17. As células foram contadas utilizando-se azul de trifan (1:100) na câmara de Neubauer em seus compartimentos.

3.3.2 Marcação de moléculas de superfície em PBMC total

1. Foi retirado volume correspondente a 20×10^6 , sendo estas centrifugadas a 400xg por 10min a 4°C, com aceleração (ACC)=9 e desaceleração(DEC)=9, sendo desprezado o sobrenadante.
2. As células foram ressuspendidas em 10 uL de Tampão FACS.
3. As células foram incubadas por 10min a 4 °C.
4. Os anticorpos foram diluídos 1:20 e adicionados a cada tubo eppendorff de 1ml de acordo com o presente a seguir, de forma que o volume final de cada amostra foi de 100µL em cada mix:
 - a) Tubo 1 : PD-L1 PE (5µL) , CD40 APC(5µL), CD14FITC (5µL) e FACS(85µL);
 - b) Tubo 2: CD86 PE-Cy5 (5µL), CD14-FICT(5µL), FACS(90µL);
 - c) Tubo 3: HLA-DR PE (30µL), FACS(70µL);
 - d) Tubo 4: CD44-APC (5µL), CD14-FICT (5µL), FACS(90µL);
 - e) Tubo 5: CD4 PERCP (5µL), CD8PE (5µL), CD45-RA(90µL);
 - f) Tubo 6: CD4 PERCP(5µL), CD8 PE(5µL), CD45RA APC (5µL), CD45RO FICT (5µL) e FACS(80µL);

- g) Tubo 7: CD4 PERCP(5 μ L), CD8 FITC(5 μ L), CD25 PE (5 μ L), CD44 APC (5 μ L) e FACS(80 μ L);
 - h) Tubo 7: CD3FITC(5 μ L), CD4 PERCP (5 μ L), CD8 PE (5 μ L), FACS (85 μ L);
 - i) Tubo 8: CD4 PERCP(5 μ L), CD8 FITC (5 μ L), Anexina 5 APC(5 μ L), FACS (85 μ L). Foram adicionados 10 μ L de PI na hora de fazer a leitura no Citometro de fluxo.
5. As células foram incubadas a 4°C por 20 minutos com estes anticorpos.
 6. As células foram centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos a 4°C.
 7. As células foram ressuspensas em tampão FACS de forma que fique 10⁶ células/ ml.
 8. A análise da marcação de moléculas de superfície foi realizada por citometria de fluxo (Verse/BD Biosciences, San Jose, CA, USA), e analisadas pelo software FlowJo (FlowJo, USA).

3.3.3 Experimento *in vitro*:

1. As células foram divididas em 13 poços em placa de 24 poços estéril (5x10⁶ células/poço) e em 9 poços na placa de 96 poços estéril (10⁶ células /poço), de forma que no item 4 chegamos a 1ml por poço na placa de 24 poços e em 200 μ L por poço na placa de 96 poços.
2. As poços foram divididos em: a- Controle negativo (4 poços na placa de 24 poços e 3 poços na placa de 96 poços); b- Experimento (4 poços na placa de 24 poços e 3 poços na placa de 96 poços); c- Controle positivo (4 poços na placa de 24 poços e 3 poços na placa de 96 poços) e um dos poços da placa de 24 poços foi mantida sem estímulo para correção dos parâmetros do citômetro antes da leitura.
3. Nos poços marcados como experimento foi adicionado antígeno solúvel de Leishmania 10 μ L por ml de poço e nos poços marcados como controle positivo foi adicionada concavalina A(Concentração de 5mg/ml) 15 μ L por ml de conteúdo do poço.

4. O volume total de cada poço foi completado para 1ml na placa de 24 poços e para em 200 μ L nas placas de 96 poços com solução de RPMI +10% de SBF e 1% de Antibiótico.
5. As placas foram encubadas por 48hs (placa de 24 poços) e 44hs (placa de 96 poços) em estufa 37°C 5% de CO².
6. Após a cultura por 48hs as moléculas de superfície das placas de 24 poços foram marcadas com anticorpos. Os anticorpos foram diluídos 1:20 e adicionados a cada tubo eppendorff de 1ml de acordo com o presente a seguir, de forma que o volume final de cada amostra foi de 100 μ L em cada mix:
 - a) Tubo 1: PD-L1 PE(5 μ L), CD40 APC(5 μ L), CD14FITC (5 μ L) e FACS(85 μ L);
 - b) Tubo 2: CD86 PE-Cy5 (5 μ L), CD14-FICT(5 μ L), FACS(90 μ L);
 - c) Tubo 3: HLA-DR PE (30 μ L), FACS(70 μ L);
 - d) Tubo 4: CD44-APC (5 μ L), CD14-FICT (5 μ L), FACS(90 μ L);
 - e) Tubo 5: CD4 PERCP (5 μ L), CD8PE (5 μ L), CD45-RA(90 μ L);
 - f) Tubo 6: CD4 PERCP(5 μ L), CD8 PE(5 μ L), CD45RA APC (5 μ L), CD45RO FICT (5 μ L) e FACS(80 μ L);
 - g) Tubo 7: CD4 PERCP(5 μ L), CD8 FITC(5 μ L), CD25 PE (5 μ L), CD44 APC (5 μ L) e FACS(80 μ L);
 - h) Tubo 7: CD3FITC(5 μ L), CD4 PERCP (5 μ L), CD8 PE (5 μ L), FACS (85 μ L);
 - i) Tubo 8: CD4 PERCP(5 μ L), CD8 FITC (5 μ L), Anexina 5 APC(5 μ L), FACS (85 μ L). Foram adicionados 10 μ L de PI na hora de fazer a leitura no Citômetro de fluxo.
7. Após completadas as 44hs de cultura, 10 μ L de blefeldina A(100 μ L/ml) foi adicionado a cada poço presente na placa de 96 poços.
8. A placa de 96 horas foi encubada por mais 4hs em estufa 37°C 5% de CO².
9. Após encubação foram marcadas as moléculas de superfície: CD4 PERCP, CD8 FICT (Diluição 1:20, 20 μ L por amostra) e volume total de 80 μ L.

10. A membrana foi permeabilizada com BD Perm/Wash Bd Biosciences (Lakes, New Jersey- USA) com volume total de 2ml.
11. A amostra foi dividida em dois tubos com 1ml cada
12. Um dos tubos foi marcado com IFN- γ PE e o outro com Granzima B PE.
13. A análise da marcação de moléculas de superfície foi realizada por citômetria de fluxo (Verse/BD Biosciences, San Jose, CA, USA), e analisadas pelo software FlowJo (FlowJo, USA).

3.4 REVISÃO DA LITERATURA

Foi realizada busca em artigos com as palavras chave “Diffuse cutaneous Leish*” ou “Diffuse Leish*” na base de dados PubMed-NCBI sendo analisados os artigos a partir de 1970. Foram lidos os resumos de todos os artigos, e quando não foi possível excluir a elegibilidade pela leitura dos resumos, os trabalhos completos foram lidos. Além disso a lista de referências dos artigos selecionados foi lida a procura de novas referências que se encaixassem nos critérios do estudo. Os critérios de inclusão foram: 1- Estudos em humanos que incluíssem pacientes com o diagnóstico de LCD; 2- Estudos poderiam ser *in vivo* ou *in vitro*, mas deveriam incluir tecidos, células ou soro de pacientes com o diagnóstico da doença; 3- Os estudos deveriam avaliar possíveis alterações imunológicas nos sujeitos. Estudos foram excluídos se: 1- Não fossem estudos primários; 2- não incluíssem humanos; 3- não estudassem tecidos ou células de indivíduos com LCD, como por exemplo, estudos de incluam apenas Leishmanias derivadas de pacientes com a doença; 4- Não realizassem estudo imunológico dos pacientes; 5- Artigos os quais não fosse possível conseguir o texto completo. O simples estudo da IDR ou de histopatológico com colorações habituais não foi considerado estudo imunológico. O texto completo era conseguido através de acesso aos periódicos CAPES, solicitação à Rede informática de medicina avançada-RIMA, solicitação nos sites eletrônicos das revistas e ainda solicitação aos autores por e-mail e através do portar Research gate.

Este projeto foi realizado de acordo com os parâmetros éticos e sua realização foi aprovada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da

Universidade de Brasília (Parecer CE-FM/Unb número: 1.521.691), o parecer encontra-se em anexo.

4 RESULTADOS

O diagnóstico de Leishmaniose difusa foi realizado através da apresentação clínica com uma placa ulcerada em dorso nasal. No momento da realização da biópsia o paciente referia ter utilizado topicamente “leite de anões”, sendo que evoluiu com prurido e descamação locais, que anteriormente não existiam (Figura 20). As amostras do aspirado da lesão foram inoculadas no meio McNeal, Novy & Nicolle (NNN) e foi realizado esfregaço por imprint dos fragmentos de pele, sendo que ambos foram positivos para *Leishmania* sp.

O exame histopatológico de lesão em dorso nasal mostrou infiltrado derme papilar estendendo-se à derme profundo acentuada infiltração celular constituindo-se por histiócitos vacuolizados abarrotados por amastigotas de *Leishmania* (data da coleta 09/12/2015) (Figuras 21, 22 e 23). Revisão de revisão de histopatológico coletado em outro serviço mostrou: Fragmento de pele não ulcerada, que exhibe no derma papilar estendendo-se até o derma profundo acentuada infiltração celular constituído por histiócitos vacuolizados abarrotados por amastigotas de *Leishmania*. De permeio observam-se focos esparsos de infiltrado linfoplasmocitário que se adensam no limite profundo da lesão na medida em que se tornam mais escassos os histiócitos vacuolizados. Não foram observadas áreas de necrose ou reação granulomatosa de qualquer natureza. Como rotina de acompanhamento dos pacientes com LTA no hospital universitário, também foi realizada avaliação otorrinolaringológica, sendo possível se verificar a presença de lesão polipoide em fossa nasal direita que ao exame histopatológico mostrou: Estrutura polipoide revestida por epitélio respiratório sem atipias. No córion, há edema com denso infiltrado inflamatório misto com predomínio de plasmócitos e numerosos eosinófilos. Parasitas não foram evidenciados.

De permeio observam-se focos esparsos de infiltrado linfoplasmocitário que se adensam no limite profundo da lesão na medida que se tornam mais escassos os histiócitos vacuolizados. Não foram observadas áreas de necrose nem de reação granulomatosa de qualquer natureza. A sorologia para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi negativa. A reação IDRM e a imunofluorescência indireta foram negativas. A reação em cadeia da polimerase (PCR) ITS1 identificou a espécie *L. (L.) amazonensis*.



Figura 20 — placa eritematosa em dorso nasal-pequena crosta serohemática presente se refere ao local da biópsia. Foto retirada antes de qualquer tratamento.

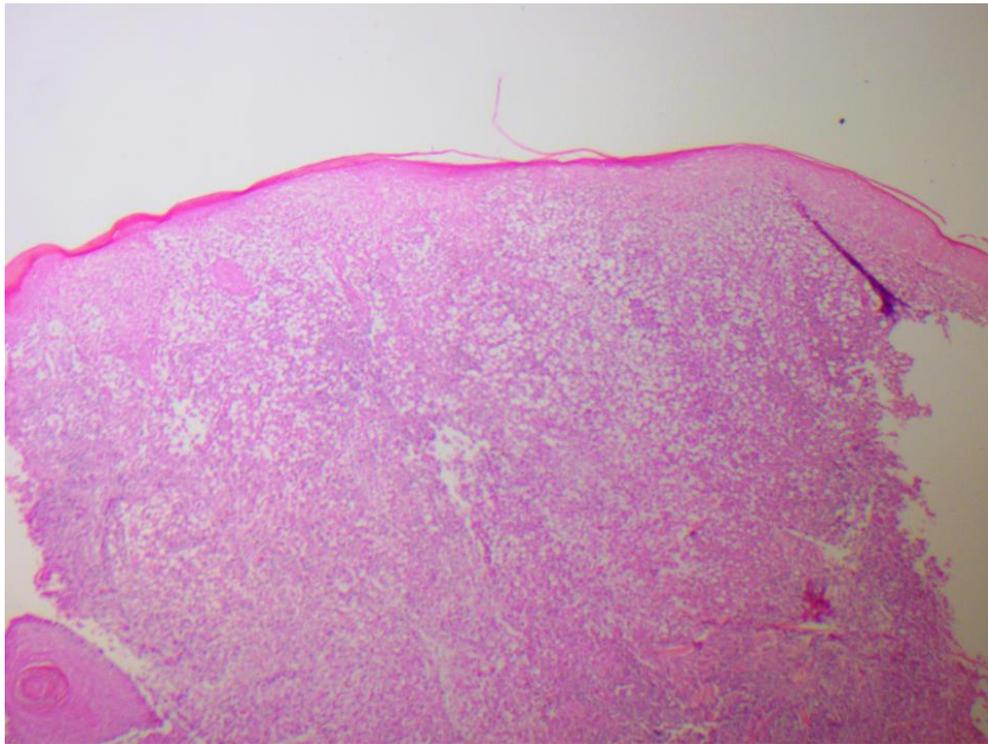


Figura 21 — Exame histopatológico (data da coleta 09/12/2015) Infiltração celular que se estende da derme papilar até a derme profunda (Hematoxilina e eosina-Objetiva de 4x).

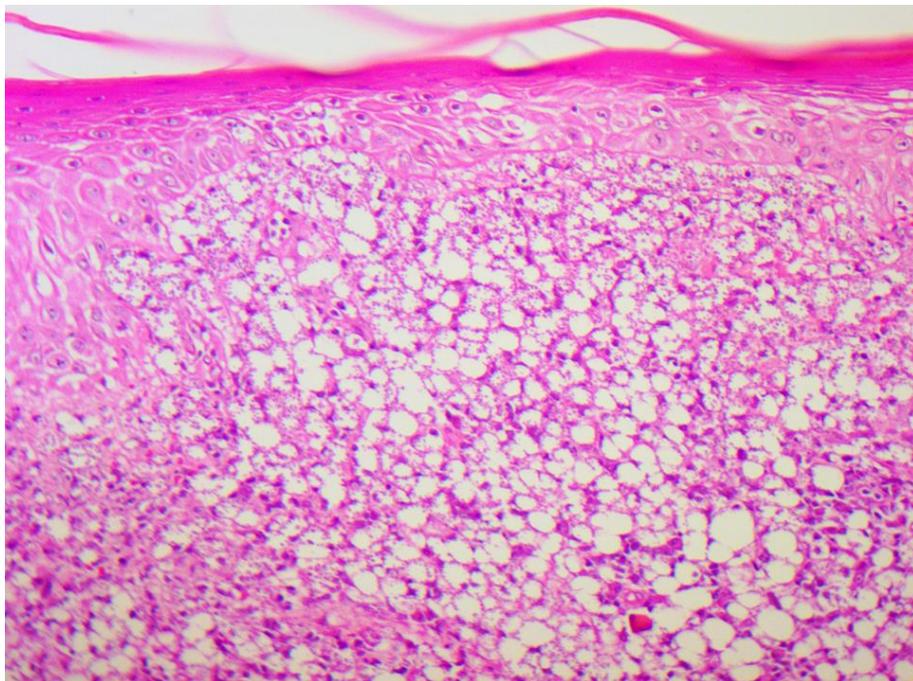


Figura 22 — Exame histopatológico (data da coleta 09/12/2015). Infiltrado é composto majoritariamente por histiócitos vacuolizados que não formam granulomas. Não são observadas células gigantes (Hematoxilina e eosina-Objetiva de 40x).

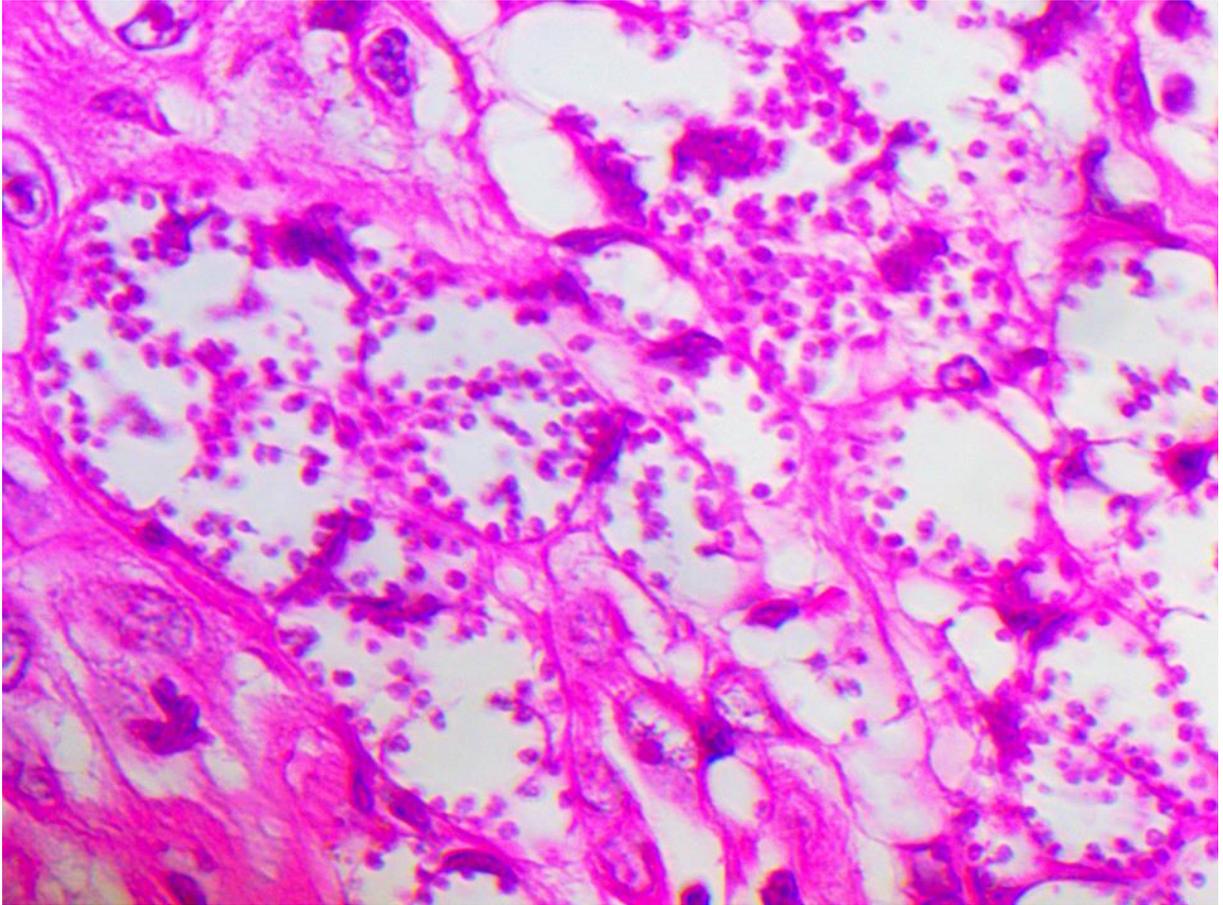


Figura 23 — Exame histopatológico (data da coleta 09/12/2015). Em grande aumento é possível observar a presença de numerosas estruturas intracelulares compatíveis com amastigotas no interior dos histiócitos vacuolados. (Hematoxilina e eosina- Objetiva de 100x).

4.1 ACOMPANHAMENTO CLÍNICO

O paciente foi inicialmente tratado com antimoníato n-metil glucamina - *Glucantime*®- (20 mgSbV/kg/dia) por 20 dias de acordo com o preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS)(73). Após um mês sem tratamento sendo constada a riqueza parasitária no histopatológico foi firmado o diagnóstico de LCD. Neste momento o paciente apresentava-se sem melhora clínica (Figura 24). Foi, então, reiniciado o tratamento com a associação de drogas: antimoníato de n-metil glucamina (20 mg SbV/kg/dia) e Alopurinol (1200mg/Dia). O tratamento com

antimoniato de n-metil glucamina NMG foi interrompido após a administração de uma dose acumulada de 44,625g/SbV devido a intensa mialgia. Após interrupção de uma semana, o tratamento foi reiniciado até atingir-se uma dose de 53,55g/SbV. Sendo assim, o tratamento com NMG foi realizado em um período de 3 meses e posteriormente permaneceu utilizando apenas alopurinol. A imunofluorescência indireta foi negativa nos dias 11/12/15, 14/3/16, 10/8/16, 8/2/17, 24/11/17, mas foi positiva na coleta realizada dia 9/11/16.



Figura 24 — Fotos da lesão do paciente um mês após o tratamento convencional

Durante o período o paciente foi submetido a exames de rotina no acompanhamento de pacientes com Leishmaniose tegumentar americana (Tabela 5).

No dia da coleta de das PBMC para o experimento, paciente não apresentava lesão clínica, como pode-se observar na figura 25.

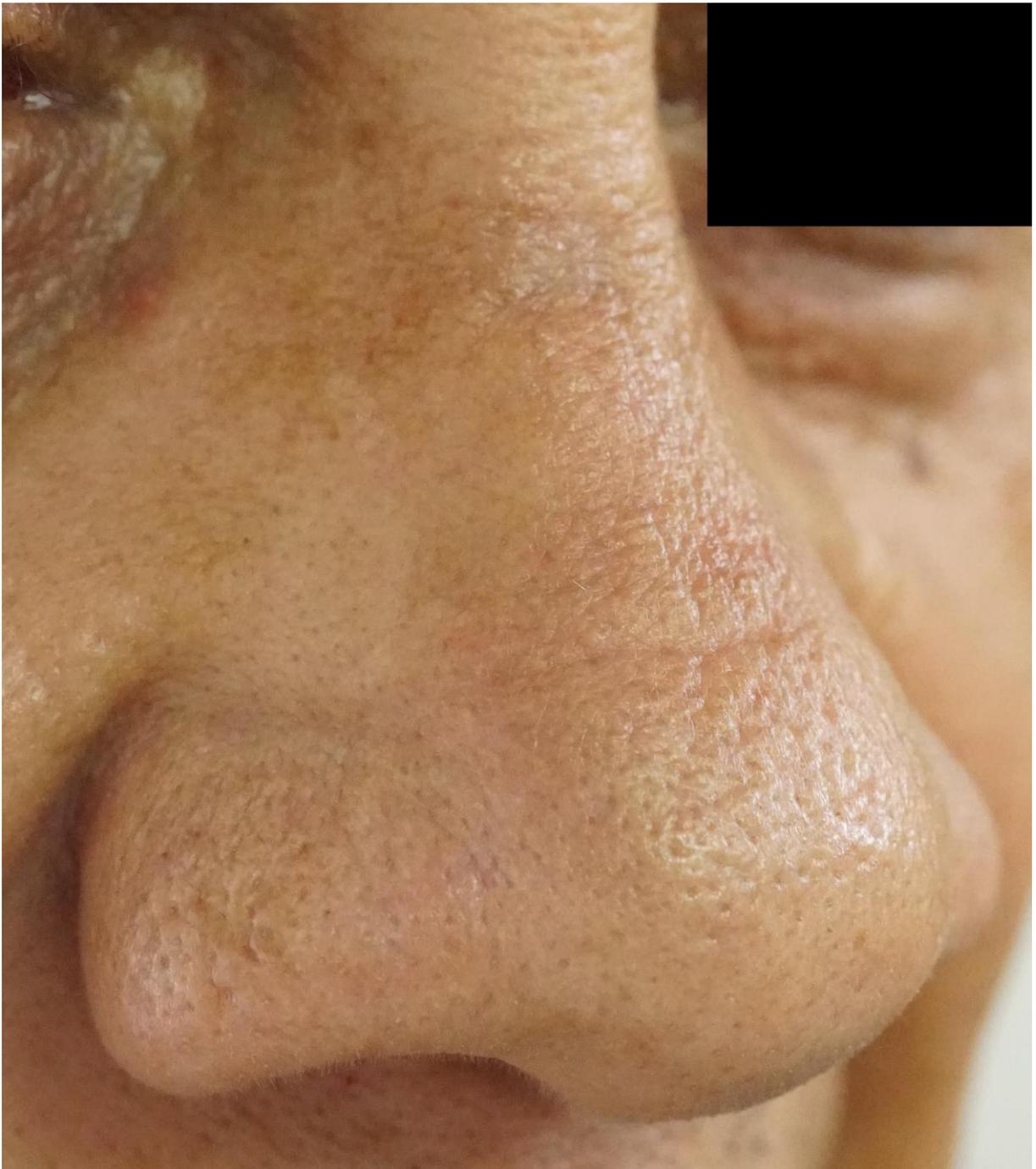


Figura 25 — Aspecto do dorso nasal a época da coleta do sangue para o experimento.

Tabela 1 — Resultados de exames realizados durante acompanhamento do paciente.

	Valores de referência-HUB	Data da coleta								
		16/12/15	23/12/15	30/12/15	3/2/16	10/2/16	17/2/16	24/2/16	2/3/16	2/3/16
Hemoglobina (g/dl)	13-17		12.7		12.4	13.2	11.6	11.9		11.3
Leucócitos (nº/mm3)	4000-11000		5570		8270	8150	6760	6410		14420
Plaquetas (mil/mm3)	140-450		351		335	403	384	348		37900
Velocidade de hemossedimentação (mm/1h)	até 15					16				
Creatinina (mg/dL)	0,7-1,3	1.2	0.9	1.1	1	1.1	1	1.1	0.9	
Uréia (mg/dL)	17 a 43	30	29	28	35	24	27	32	26	
Desidrogenase láctica(U/L)	140-271				157	141	155	180	192	
Fosfatase alcalina (U/L)	30-120	58	62	79	86	92	87	98	113	
Bilirrubina total (mg/dL)	0,3-1,2	0.3	0.34	0.34	0.27	0.49	0.27	0.34	0.4	
Bilirrubina Direta (mg/dL)	até 0,2	0.04	0.08	0.06	0.04	0.09	0.06	0.07	0.09	
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,1-0,9	0.26	0.26	0.28	0.23	0.4	0.21	0.27	0.31	
Glicemia de jejum (mg/dL)	70-99	110	114	97	116	101	84	93	108	
Creatinofosfoquinase(U/L)	30-223			75		70		83	81	
Proteínas Totais (g/dL)	6-8,3				7.9	8.7			7.6	
Albumina (g/dL)	3,5-5				4.5	4.7	4.2		4.1	
Globulina (g/dL)	1-3				3.4	4			3.5	
Relação Albumina/Globulina	0,9-2				1.3	1.2			1.2	
Amilase (U/L)	29-103				69	113			75	
Transaminase Glutâmico-Oxalacética(U/L)	até 50	17	29	27	18	22	26	42	39	
Transaminase Glutâmico-Pirúvica(U/L)	até 52	13	21	27	13	16	17	28	34	
Sódio (mEq/L)	135-144	131	137	138	132	134	138	132	135	
Potássio (mEq/L)	3,5-5	4.1	3.9	4.8	4.1	3.9	4.4	4.1	4.3	
Cloro (mEq/L)	98-111				98	99	104	99	102	
Cálcio Sérico(mg/dL)	8,4-10,3				9.3	10.3				
Magnésio (mg/dL)	1,6-2,6						2.3	2.3		

4.2 EXPERIMENTOS *EX-VIVO* E *IN VITRO*

Os experimentos *ex vivo* mostraram que os monócitos expressaram altas porcentagens de CD14, CD40, CD44, HLA-DR e CD86 e baixas porcentagens de CD80 e PD-L1 (Figura 26), sendo também analisadas as moléculas de superfície de linfócitos (Figura 27). Os experimentos *in vitro* confirmaram que as células estavam viáveis, e nenhuma diferença entre os marcadores de morte celular entre as células estimuladas com o (antígeno solúvel de *Leishmania*) SLA e os controles negativos (não estimuladas) foram observadas (Figura 28). Verificou-se um aumento da expressão da molécula inibitória PD-L1 em monócitos reestimulados *in vitro* com o SLA (aproximadamente 65%), ao passo que apenas 35% das células do controle negativo expressavam esta molécula (Figura 29). Somado a isso, 8,32% dos controles negativos eram positivos para CD4+IFN- γ +, mais esta porcentagem diminuiu para 1,7% após a estimulação com o SLA. A análise dos controles negativos mostrou que 14% destas células eram CD8+IFN- γ +, mas esta porcentagem diminuiu para 1% após a reestimulação pelo SLA. Nós também observamos uma diminuição relevante da expressão de granzima B em linfócitos T CD8+, de 31% nos controles negativos para 5% após a reestimulação com o antígeno de *Leishmania* (Figura 30). A expressão de CD80, CD86 e CD40 foi semelhante entre o controle negativo e as células estimuladas com SLA (Tabela 6).

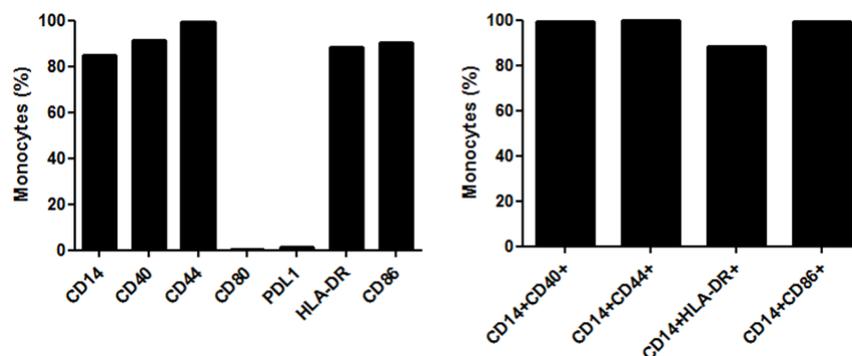


Figura 26 - Expressão *ex vivo* de marcadores estudados na superfície de monócitos derivados de PBMC.

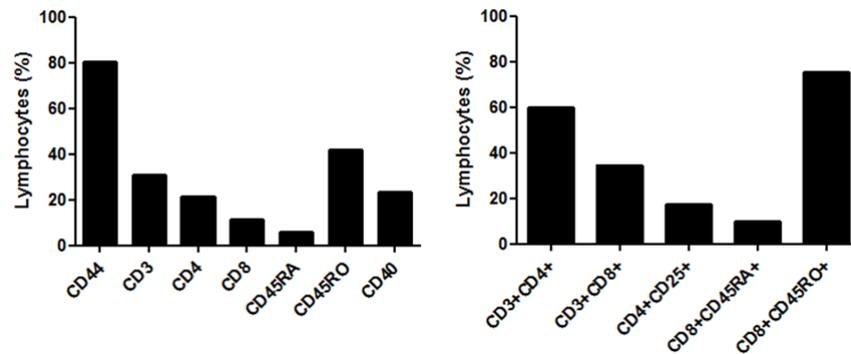


Figura 27- Expressão ex vivo de marcadores da superfície de linfócitos derivados de PBMC.

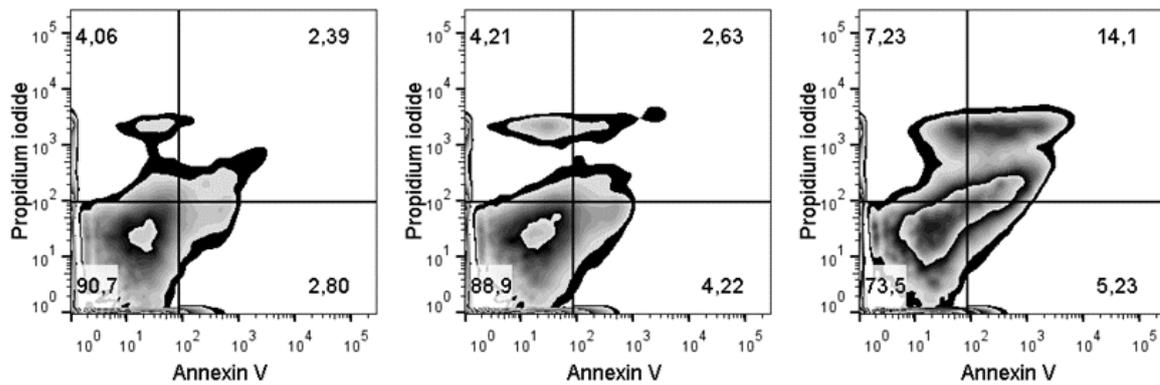


Figura 28 - Avaliação de apoptose e morte celular através do ensaio de iodeto de propídio e anexina 5, as células encontravam-se viáveis.

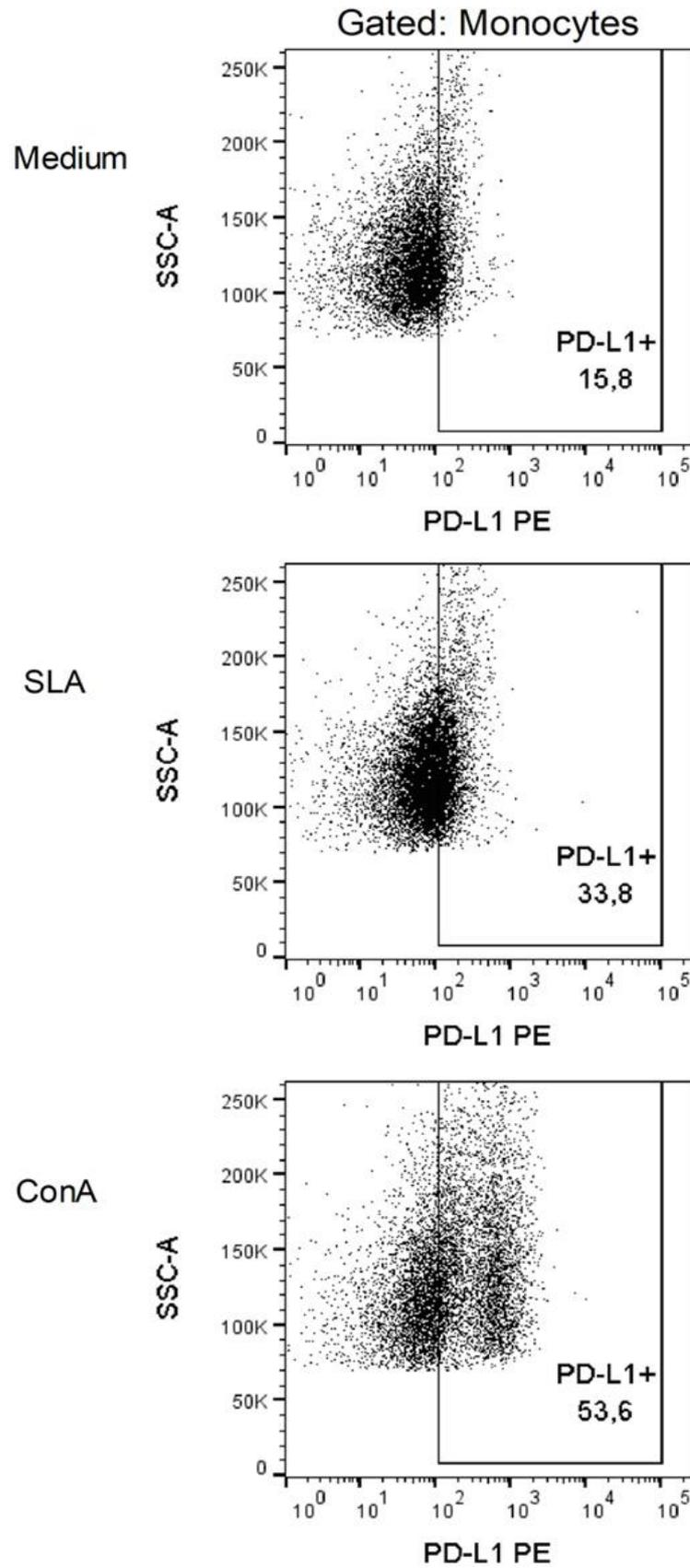


Figura 29 - Expressão in vitro de PD-L1 em monócitos após 48hs de estímulo com SLA e nos controles positivo e negativo.

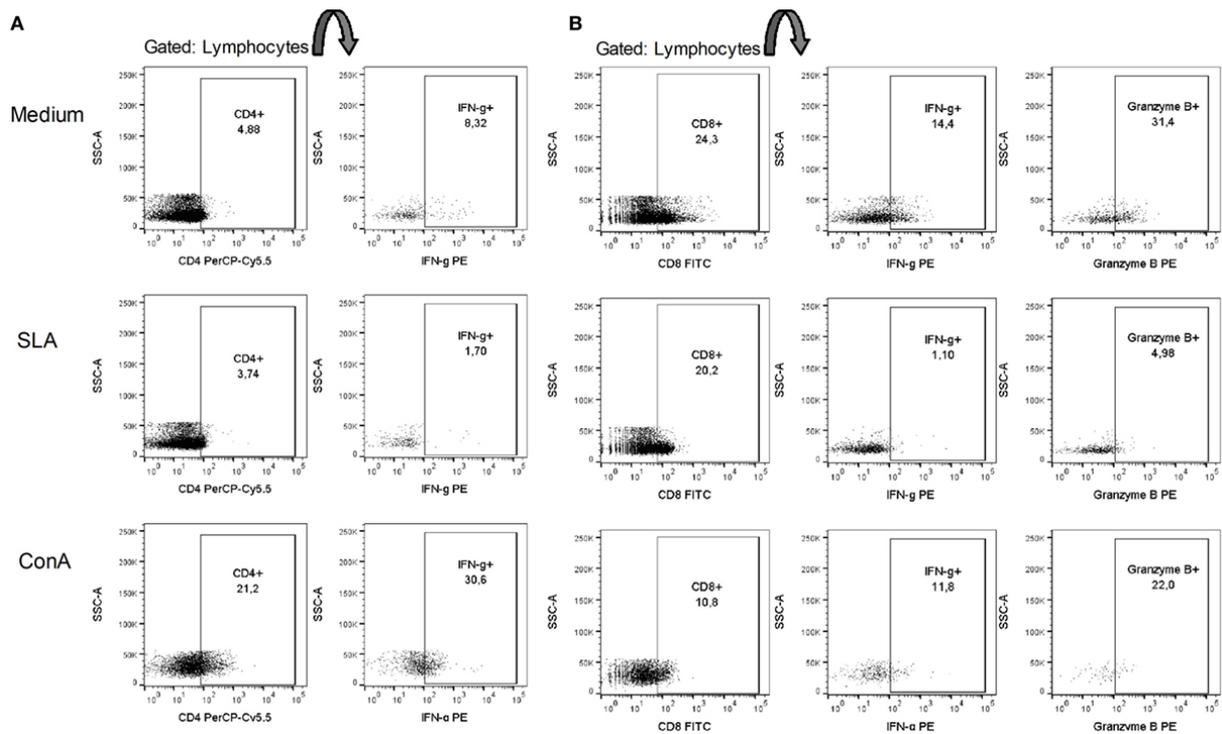


Figura 30 - Expressão in vitro de IFN- γ e granzima B em linfócitos CD8+ e de IFN- γ em linfócitos CD4+ após 48hs de estímulo com SLA e nos controles positivo e negativo.

Tabela 2 - Expressão de moléculas de superfície de monócitos ex vivo e in vitro. As PBMCs do paciente foram marcadas com anticorpos específicos contra moléculas se superfície de monócitos. As moléculas foram analisadas na superfície de monócitos separados por tamanho (FSC) e granulosidade(SSC).

Moléculas de superfície	<i>Ex vivo</i>	<i>In vitro</i>		
		Meio	SLA	ConA
CD14	84.9	98.3	96	59.6
CD44	99.3	99.4	99.5	97.6
HLA-DR	88.5	86.4	94.8	25.6
CD86	90.4	78.7	81.2	5.22
CD80	0.46	25.2	32.5	5.2
CD40	91.3	97.1	97.4	71.9
PD-L1	1.19	35.5	64.9	43.2

4.3 DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Foram lidos 501 resumos sendo que após a leitura completa foi possível incluir 64 trabalhos na revisão, um dos quais é resultado do estudo aqui

apresentado. Não foi possível avaliar a elegibilidade devido a indisponibilidade dos textos completos dos artigos de: Da Fonseca Ade; Araujo Rda e cols. 1981; Bittencourt and Rodrigues de Freitas 1983; Cavelier, Bertail e cols. 1984; Schurr, Kidane et al. 1986; Veress, el Hassan e cols. 1986; Schurr, Wunderlich et al. 1987; Guenoun, Doukan e cols. 1990; Morsy, Romia e cols. 1990; Convit and Ulrich 1993; Wermert, Lamblin e cols. 1999)(134, 300-308). A tabela completa com os artigos que não preencheram os critérios para serem incluídos na revisão e o motivo da não inclusão encontra-se no apêndice. Uma tabela resumo com os principais achados dos artigos incluídos encontra-se exposta na tabela 7.

Quadro 5 - Resumo das principais características e achados dos estudos incluídos.

Ano	Autor	País	Ensaios realizados	Formas clínicas	Espécies	Principais achados	Principais conclusões
2018	Campos e col(309)	Brasil	Imuno-histoquímica	LC, LM, LCDB, LCD	<i>L.(V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	LT CD8+ e LT CD4+ foram menos expressos na LCD. Expressão de TNF- α foi menor na LCD, enquanto a expressão de TGF- β e IL-10 foi maior. TLR2 e TLR4 foram mais expressos nas formas causadas por <i>L. (V.) braziliensis</i> e TLR9 nas formas causadas por <i>L. (L.) amazonensis</i> . Nas formas causadas por <i>L. (L.) amazonensis</i> o TLR2 foi menos expresso na LCD que na LC.	O TLR2 é menos expresso na LCD que na LC em casos causados pela <i>L. (L.) amazonensis</i> .
2017	Malta-Santos e col(310)	Brasil	Níveis plasmáticos	LC e LCD	Não reportada	Nível aumentado de Resolvina D1 em pacientes com LCD quando comparado aos com LC. Os níveis de Resolvina D1 foram positivamente associados a os de TGF- β e negativamente aos de TNF- α .	A Resolvina D1 está aumentada sistemicamente em pacientes com LCD e isso está associado ao ambiente anti-inflamatório presente nestes pacientes
2016	França-costa e cols(311)	Brasil	Níveis plasmáticos, imuno-histoquímica, mRNA nas lesões	LC, LCD e controles saudáveis	Não reportada	Comparado com os pacientes com LC, os com LCD tiveram maiores no plasma níveis de arginase I, Ornitina descarboxilase e TGF- β e menores níveis de IL-12, MCP-1 e CXCL-10. Apresentam também maiores níveis na lesão de mRNA para Arginase I, Receptor 2 de Prostaglandina E, IL-4, IL-10 e menores níveis para TNF- α .	Arginase I, Ornitina descarboxilase, PGE2 e TGF- β implicados incapacidade de pacientes com LCD montar uma resposta imune efetiva
2016	Fernandez-Figueroa e cols(312)	México	Estimulação de células NK de sangue periférico com LPG de <i>Leishmania mexicana</i>	LC e LCD		A inibição de genes que contribuem para a regulação das vias sinalizadoras TLR e JAK/STAT afetam diferentes moléculas em células NK: Fatores de transcrição(NF-kB e STAT-1), Receptores de citocinas (IFN- γ R2 e IL-12R β 2) e	Importantes genes envolvidos na resposta imune inata principalmente das vias sinalizadoras TLR e JAK/STAT estão inibidos na LCD.

Continua

						citocinas(TNF- α). Sendo estas alterações relacionadas a LCD.	
2014	Caneda-Guzman e cols (313)	México	Estimulação de células NK de sangue periférico com LPG de <i>Leishmania mexicana</i> , Imuno-histoquímica, expressão gênica	LC, LCD e controles saudáveis		LCD apresentaram menores níveis de células NK nas lesões e no sangue periférico. Estas células apresentavam produção diminuída de TNF- α e IFN- γ e menor expressão de TLR2, TLR1 e TLR6 que células de Pacientes com LC.	Pacientes com LCD apresentam diminuição no número e na atividade de células NK.
2013	Khoury e cols(314)	Brasil	Avaliação de níveis plasmáticos e expressão na lesão de mRNA	LC, LCD e controles saudáveis	<i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	Os níveis médios SOD1 do hospedeiro foram maiores nos pacientes com LCD que nos com LC causadas por <i>L. (L.) amazonensis</i> . Houve também correlação entre os níveis de SOD1 do hospedeiro e SOD2 e SOD4 parasitárias na análise in situ.	O SOD1 não é apenas um marcador, mas uma molécula chave na patogênese da LCD levando a disseminação e proliferação persistente.
2013	Diaz e cols(315)	Venezuela	Imuno-histoquímica	LC, LCI e LCD	Não reportada	Pacientes com LCD expressam menos CCL4, CXCR3 e CCR7 quando comparado a pacientes com LC, mas expressam mais CCL11	Pacientes com LCD apresentam menor expressão de quimiocinas relacionadas com a resposta imune Th1, expressando mais CCL11 o que contribui para o recrutamento de células CCR3+.
2013	Buxbaum(316)	México	ELISA; Imunofluorescência direta; Produção in vitro após estimulação com parasitos opsonizado com soro de diferentes pacientes	LC, LCD e controles saudáveis	<i>L. (V.) mexicana</i>	Os pacientes com LCD apresentam anticorpos contra GIPLs no soro, sendo estes maiores que de pacientes com LC. Estes anticorpos se ligam a superfície do parasito e estimulam a produção de IL-10 por monócitos.	Pacientes com LCD produzem anticorpos contra GIPLs e estes quando ligados ao parasita são capazes de estimular a produção de IL-10.
2012	Fernandez-Figueroa e cols(317)	México	Polimorfismos genético dos locus de citocinas de interesse, Western blot no soro, produção por monócitos derivados de	LCD, LC e CS	Não reportada	Na LCD foi possível observar maiores níveis séricos de IL-1 β que na LC e nos CS. E Monócitos do sangue periférico produziam mais IL-1 β na LCD que na LC. Houve marcação difusa positiva para IL-1 β nas	Na LCD a IL-1 β está aumentada no soro e é produzida por monócitos, estando presente nas lesões, mas não sendo capaz de destruir o parasito.

			PBMC e Imuno-histoquímica			lesões de LCD, nas na LC a marcação foi apenas na membrana celular.	
2011	Vivarini e cols(318)	Brasil	Imuno-histoquímica	LC e LCD	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Pacientes com LCD tiveram maior número de células PKR+ e IFN-β positivas que os pacientes com LC.	A razão pela qual os pacientes com LCD apresentam maior expressão de PKR e IFN-β ainda é obscura.
2010	Hernandez-Ruiz e cols(319)	México	Estimulação de LT CD8+ com monócitos infectados(Moi) e avaliação dos marcadores por citometria de fluxo e ELISA, imuno-histoquímica de lesões, Ensaio de citotoxicidade por 51Cr.	LC e LCD	Não reportada	Pacientes com LCD tiveram um índice citotóxico(IC) de 0.4 enquanto pacientes com LC este foi de 19.8. O ensaio de 51Cr mostrou uma porcentagem média de citotoxicidade de 3% na LCD enquanto esta foi de 18% na LC. LT CD8+ de pacientes com LCD tiveram menor proliferação e produziram menos IFN-γ após estímulo com MOi. Estimulo de TLR2 com LPG ou Pam3Cys foi capaz de recuperar a citotoxicidade, proliferação e produção de IFN-γ, além de diminuir a expressão de PD-1 nos TL de pacientes com DCL estudados.	LT CD8+ de pacientes com DCL não tem a atividade citotóxica contra macrófagos infectados com <i>L. (L.) mexicana</i> tendo características funcionais e fenotípicas de exaustão. E a estimulação de TLR2 pode restaurar funções efetoras.
2010	Campanelli e cols(320)	Brasil	Imuno-histoquímica	LC, LCD e controles saudáveis	Não reportada	Pacientes com LCD tiveram menor expressão de CCR5, CCR4, CCR3 e CCL17 que pacientes com LC, mas tiveram maior expressão de CCL7.	Embora o número de células T na LCD seja escasso, uma hipótese é que o CCL7 poderia atrair células Th2 para o local da lesão.
2009	Carneiro e cols(321)	Brasil	Imuno-histoquímica	LC, LCD, LM, LDS, e controles saudáveis	Pacientes com LC e LM de áreas de <i>L. (V.) braziliensis</i> e LCD de áreas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	Os números de LT CD45RO+, CD4+ e os CD8+ além de LB CD20+ foram menores nos pacientes com LCD que nos com LC. Os números de células FoxP3+ foi maior na LCD.	O número elevado de células Treg pode estar relacionada a hiporresponsividade da observada na LCD.
2009	Pereira e cols(322)	Brasil	Análise de PBMC e imuno-histoquímica de lesão antes e após	LCD	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Tratamento do paciente com imunoterapia (vacinas associadas a BCG) levou a um aumento de monócitos	Importância da ativação do sistema imune inato para o controle da LCD.

			imunoterapia			CD14+CD16+ e células NK CD16+CD56+ no sangue periférico. Lesões em melhora apresentaram aumento de linfócitos CD56+ comparado com lesões ativas.	
2009	Fernandez-mestre e cols(323)	Venezuela	Análise dos genótipos do gene de CTLA4	LC, LCD e LCI	Não Reportado	Pacientes com LCD apresentavam maior frequência do genótipo A/G+49 quando comparados com os que tinham LC e estes mais frequentemente o genótipo A/A+ 49 quando comparados aos com LCD.	O genótipo A/G+49 está ligado a proliferação anormal de LT pode estar associado a LCD já o genótipo A/A+49 que está ligado a proliferação normal de LT é um fator protetor.
2007	Coutinho e cols(324)	Brasil	Níveis de citocinas e proliferação de PBMC após estimulação com antígenos	LCD	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Houve proliferação após estimulação com antígenos <i>T. gondii</i> e ConA mas ausência de proliferação com os antígenos de <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) brasiliensis</i> . Os níveis de IFN- γ foram muito baixos após estimulação com os antígenos de <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) brasiliensis</i> mas foram altos após estimulação com ConA e antígeno de <i>T. gondii</i> .	No caso não houve resposta aos antígenos de Leishmania, mas houve resposta a estimulação com o antígeno de <i>T. gondii</i> e ConA.
2007	Galindo-Sevilla e cols(325)	México	Níveis séricos e positividade de PBMC para marcadores estudados	LCD, LC e controles saudáveis	<i>L. (L.) mexicana</i>	Menores valores de DHEA e cortisol e maior valor de IL-6 em pacientes com LCD comparado CS. Altos títulos de anticorpos específicos em pacientes com LCD. Porcentagem de células CD4+IFN- γ + tendeu a ser menor na LCD.	DHEA e cortisol foram menores em pacientes com LCD e se correlacionaram com baixos valores de IFN- γ e IL-6.
2007	Hernandez-Ruiz e cols(326)	México	Apoptose de monócitos autólogos infectados após contato com células CD8+ de sujeitos estudados	LC e LCD	Não reportado	Monócitos de pacientes com LCD apresentaram maior apoptose que de pacientes com LC.	
2007	Carrada e cols(327)	México	Estimulação de monócitos in vitro e medida de citocinas por ELISA	LC e LCD	Área endêmica para <i>L. (L.) mexicana</i>	após estímulo com LPG de <i>L. (L.) Mexicana</i> pacientes com LCD não produziram IL-15, IL-18 e tenderam a produzir menos TNF- α	A capacidade diminuída de produzir citocinas pro inflamatórias inatas quando estimuladas com LPG é uma

Continuação

						e IL-12 com a gravidade da doença. A expressão de CD86 foi maior na LCD que na LC.	possível causa de progressão da doença na LCD.
2006	Diaz e cols(328)	Venezuela	Imuno-histoquímica	LC, LCI e LCD	Não reportado	Em Lesões de LCD houve menor positividade de células para IL-12, IFN- γ e Oxido nítrico sintetase induzível.	Pacientes com LCD apresentam menor quantidades de células expressando iNOS, IFN- γ e IL-12 em suas lesões.
2005	Xavier e cols(329)	Brasil	Imuno-histoquímica	LC, LCD e CS	<i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.)sp</i>	Menor densidade de células de Lagerhans CD1a+ na LCD comparado com LC. Tendência a maior densidade nas formas causada por <i>L. (L.) amazonensis</i> que nas por <i>L. (V.) sp</i> , exceto na forma difusa.	LCD teve uma menor população de células de Langherans que a LC.
2004	Convit e cols (330)	Venezuela	ELISA do soro	LC e LM	Não reportado	Após imunoterapia contendo promastigotas mortos de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> associada ao BCG pacientes com LCD que tinham IDRMs de 0mm desenvolveram positividade da IDRMs que foi em média de 18.7, mas não houve mudança no isotipo de IgG anti Leishmania predominante	Imunoterapia foi capaz de positivar a IDRMs em pacientes com DCL não mudou o isotipo de IgG predominante.
2004	Silveira e cols(88)	Brasil	Imuno-histoquímica e mRNA nas lesões	LC, LCDB, LM	<i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	LCD tem as menores quantidades de células T CD4+ e CD8+ quando comparada com a LC e a LCDB. Expressão de mRNA de IFN- γ também foi menor que nas outras formas, enquanto a expressão de IL4 foi maior.	LCD leva a resposta CD4+Th2 antígeno específica resultando em proliferação de LT CD4+ que produzem principalmente IL-4 e IL-10 no sangue periférico e nas lesões.
2003	Cabrera e cols(331)	Venezuela	Mensuração de níveis séricos	LC, LM, LCD, LCI, CS	Não reportado	Comparados com os CS os pacientes com LC, LM, LCI e LCD apresentavam maior produção de ON, sCD23, IgE total e IgE específica para Leishmania. Os pacientes com LCD apresentavam maiores níveis de sCD23 que os pacientes com LC.	Pacientes com LCD apresentam altos níveis de sCD23 e IgE total e específico.

Continua

Continuação

2002	Diaz e cols(332)	Venezuela	Imuno-histoquímica	LCD, LC, LCI	Não explicitado	LCD apresentaram quantidade diminuída de células T CD4+ e CD8+ e os granulomas apresentavam os menores níveis de células CD69+ e CLA+ e também de células de Langherans epidérmicas CD1a+ e CD83+	Na LCD a presença de menores números de células ativadas CD69+ e CLA+ estando associado ao perfil tolerigênico desta forma.
2002	Qadoumi e cols(333)	México	Imuno-histoquímica	LC e LCD	Endêmica para L. (L.) mexicana	iNOS está presente em menores quantidades em pacientes com leishmaniose difusa	Existe correlação entre os níveis de iNOS e o desfecho da doença.
1999	Salaiza-Suazo e cols(334)	México	Imuno-histoquímica, análise de PBMC por citometria de fluxo e ELISA	LCD	L (L.) mexicana	O tratamento utilizando IFN- γ associado a pentamidina e alopurinol foi capaz de aumentar IFN- γ , diminuir IL-6, aumentar os LT CD8+, CD4+ e NK, normalizar a relação CD4+/CD8+(de 0.2 para 0.96) e restaurar a explosão oxidativa de monócitos no sangue periférico. Número de células de Langherans também aumentou. Entretanto este efeito foi temporário ocorrendo relapso meses após o tratamento	Na LCD o número inicial de células de Langerhans, LT NK e CD8+ nas lesões é diminuído. Relação no sangue periférico CD4+/CD8+ anormalmente baixa. O tratamento aumenta o número destas células no tecido e normaliza a relação CD4+/CD8+.
1998	Silveira e cols(335)	Brasil	Proliferação e produção de IFN- γ (ELISA) após estimulação com diferentes antígenos	LC e LCD	Várias espécies dos subgêneros Leishmania e Viannia, algumas L. (V.) não tem espécie identificada	Foram testados os antígenos de L.(V.) <i>brasiliensis</i> , L.(L.) <i>amazonensis</i> , PPD e os antígenos GP46/M2, A2 e P8. Os pacientes com LCD proliferaram menos em resposta ao antígeno cru de L. (L.) <i>amazonensis</i> e ao antígeno P8 e produziram menos IFN- γ em resposta ao antígeno P8 se comparados aos pacientes com LC causada por L. (L.) <i>amazonensis</i> .	Investigação das respostas aos antígenos A2 e P8 e a peptídeos presentes nestas moléculas deverão ser relevantes para o desenvolvimento e monitoramento de estratégias terapêuticas.
1997	Osland e cols(336)	Etiópia	Presença de anticorpos no soro	LC e LCD	Não reportada	Anticorpos da classe IgM contra IgG estavam presentes no soro de pacientes com LCD mas quase não foram detectados no soro de pacientes com LC. O estudo também mostrou a presença de polipeptídeos que tem	Pacientes com LCD tem anticorpos da classe IgM contra IgG no Soro.

Continua

						reação cruzada com os anticorpos humanos IgG e IgM na livreria genômica de <i>L. (L.) aetiopica</i> do país.	
1997	Akuffo e cols(337)	Etiópia	Estímulo de PBMC com antígenos e mensuração de citocinas por ELISA e por mRNA por hibridização in situ	LC, LCD e CS	<i>L. (L.) aetiopica</i>	Exposição de PBMC a promastigotas de <i>L. (L.) aetiopica</i> derivada de pacientes com LC preferencialmente induz a produção de mRNA para IFN- γ e pouco IL-10. Por outro lado, estímulo das mesmas PBMC com promastigotas derivados de pacientes com LCD induz a expressão de IL-10 ao invés de IFN- γ . E a resposta de IFN- γ independeu da origem das PBMC.	Um fator parasitário que induziria a imunossupressão o antígeno específica que ocorre na LCD.
1997	Weinstock e cols(338)	Alemanha	Níveis séricos por ELISA e Imunofenotipagem com o uso de citometria de fluxo	LCD	<i>L. (L.) major</i>	Paciente com LCD apresentou altos níveis séricos de IFN- γ , IL-2 e TNF- α e baixa expressão de HLA-DR em monócitos. Durante o tratamento com IFN- γ os níveis de citocinas e de monócitos HLA-DR+ retornaram a valores normais. mesmo após terapia não foi possível induzir a produção de IFN- γ em cultura de sangue periférico com o uso de LPS de <i>Salmonella typhimurium</i> mas foi possível utilizando ConA.	O paciente com LCD possivelmente tinha um defeito específico na produção de IFN- γ estimulado pelo LPS bacteriano mas que não afetou outras vias de produção de IFN- γ , o qual estava elevado no soro.
1997	Skeiky e cols(339)	Brasil	Estudo sorológico	LC, LCD, LM e CS	Não específica do	Foi investigada a reatividade do soro a antígenos HSP70, HSP83, LeIF 4 . Soro de LC e LM responderam mais a HSP70 e HSP83 enquanto LCD produziram mais anticorpos para HSP83. A resposta da LCD contra HSP83 é dominada por IgG4.	HSP83 foi o antígeno associado a subclasse IgG4 na LCD.
1996	Ritter e cols(340)	México	Imunohistoquímica e hibridização in situ para mRNA	LC e LCD	Área endêmica para <i>L. (L.) mexicana</i>	Em pacientes com LCD a expressão de MCP-1 foi significativamente menor que em pacientes com LC, sendo a expressão de MIP-1 α predominante.	A predominância de MCP-1 na LC é benéfica, enquanto a maior expressão de MIP-1 α na LCD se relaciona ao curso

							progressivo da doença.
1996	Rodriguez e cols(341)	Venezuela	ELISA	LC, LM e LCD	LCD: <i>L. mexicana</i> spp; LC e LM: área de <i>L. (V.) braziliensis</i>	Comparados a frequência relativa dos 4 isotipos de IgG contra promastigotas inativados e estratos solúveis de Leishmania. A LC foi dominada pela presença de IgG1, IgG2 e IgG3 e baixa IgG4. Na LM houve maior importância da IgG1. Na LCD a IgG4 foi a mais importante, mas IgG1 e IgG2 também estavam elevadas.	A LCD foi dominada por resposta IgG 4 de forma diversa que a LC e LM.
1996	Bomfim e cols(342)	Brasil	Mensuração de citocinas e mRNA em PBMC após estímulo com antígenos e PHA	LCD durante doença ativa, remissão com tratamento e relapso	Não informado	Durante a doença ativa os pacientes não expressaram mRNA para IFN- γ mas expressaram mRNA para IL-2, IL-4 e IL-10. Durante remissão houve expressão de mRNA para IFN- γ e baixa expressão para IL-10. Após relapso houve diminuída expressão mRNA para IFN- γ e para IL-10	Na remissão de LCD os níveis de IFN- γ aumentam e os de IL-10 diminuem, mas isso não é suficiente para prevenir recaída.
1995	Ulrich e cols(343)	Venezuela	ELISA	LCD, LV, MH, CS	Não informado	Reatividade contra <i>L. (L.) mexicana</i> e PGL-1 de diferentes isotipos de IgG. Ao antígeno de Leishmania pacientes com LCD produziram principalmente IgG4 e os de LV produziram mais IgG1, sendo a diferença significativa.	A determinação dos isotipos de IgG pode ser útil na avaliação da resposta a possíveis vacinas e de reinfeção ou relapso.
1995	Barral e cols(122)	Brasil	Proliferação após diferentes estímulos	LCD	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Caracterização clínica e proliferação de linfócitos de sangue periférico após estímulo com antígeno de Leishmania, PHA, ConA, PWM, Cândida e PPD. Ausência de proliferação ao antígeno de Leishmania na LCD. Diferença entre a proliferação a mitógenos entre as formas polar e subpolar	LCD apresenta ausência de resposta imune celular in vitro em testes realizados com linfócitos de sangue periférico.

Continuação

1994	Teklemariam e cols(344)	Etiópia	Proliferação linfocitária e produção de citocinas in vitro após estímulo	LCD antes e após tratamento	<i>L. (L.) aetiopica</i>	Nos dois pacientes avaliados houve aumento da proliferação linfocitária após o tratamento. Após o tratamento houve síntese de IL-2 e IFN- γ em um paciente e IL-4 em outro.	Retorno das funções de célula T após o tratamento da LCD.
1994	Akuffo e cols(345)	Etiópia	Proliferação celular de monócitos de CS e de linha CTLL, ELISA no soro	LCD, LCD curada, LC e LV	Não especificado	O soro de pacientes com LCD tinha altos níveis de sIL-2R, mas não foi capaz de inibir a proliferação de PBMC aos antígenos de <i>L. (L.) aetiopica</i> , PHA ou PPD. Também não foi capaz de inibir a proliferação da linhagem CTLL após estímulo com IL-2.	O sIL-2 não está associado a imunossupressão na LCD.
1994	Tapia e cols(346)	Venezuela	Imuno-histoquímica	LCD, LM e LC	Não informado	Lesões de pacientes com LCD expressavam menos ICAM-1 e HLA-DR que lesões de LC e LM.	O granuloma macrófágico da LCD poderia estar relacionado a defeito de sinalização da epiderme que promoveria a migração de células T virgens e Th2.
1993	Tapia e cols(347)	Venezuela	Imuno-histoquímica e expressão de mRNA nas lesões	LCD, LC, LM	Não especificado	Na LCD os LT γ δ presentes em menor quantidade que na LC mas em maior quantidade que na LM. Os LT α/β estavam menos presentes na LCD. A razão LFA-1 β /LFA-1 α foi menor na LCD que na LC e LM. O mRNA de IL-4 foi mais expresso na LCD que na LM e LC. A LCD teve maior expressão de mRNA de IL-10 e IL-5 que a LC.	A baixa razão LFA-1 β /LFA-1 α sugere um defeito na adesão celular nos granulomas de LCD. E as lesões de LCD apresentaram predomínio de citocinas Th2 IL-4, IL-5 e IL-10
1993	Caceres-Dittmar e cols(348)	Venezuela	Expressão de mRNA nas lesões por PCR	LC, LCD e LM	Não especificado	Lesões de LCD apresentaram preponderância de IL-4, IL5 e IL-10 e baixa ou nenhuma expressão de IL-6, TNF- α e IL-1 β , enquanto a LC apresentava altos níveis de IFN- α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, TNF- β e IL-2 mas baixa de IL-4, IL5 e IL-10.	Lesões de LCD apresentavam um perfil de citocinas Th2 com a presença de IL-4, IL-5 e IL-10.

Continua

Continuação

1993	El-Mogy e cols(349)	Egito	Teste de microgotas de HLA	LC, LCD e CS	Não específica do	Relação estatística positiva entre os HLA-A11, HLA-B5 e HLA-B7 e a LCD com risco relativo a CS de 7.400, 4.328 e 3002 respectivamente. Não foi encontrada relação significativa com a LC.	Associação entre LCD e HLA-A11, HLA-B7 e HLA-B5.
1993	Convit e cols(302)	Venezuela	ELISA, IDRM e transformação linfocitária ao antígeno de Leishmania	LC, LM, LCD e CS	Não específica do	Pacientes com LCD tiveram IDRM menor e menor positividade no teste de transformação linfocitária ao antígeno de Leishmania. Os títulos de anticorpos contra Leishmania nestes pacientes são altos, com muitos acima de 1/4800.	A LCD apresenta diminuição da imunidade celular e altos níveis de anticorpos.
1992	Akuffo e cols(350)	Etiópia	Proliferação linfocitária após estímulo e ensaio CTLL	LCD, LCD inicial, LCD em remissão e LC.	Não específica do	A proliferação in vitro de linfócitos em resposta a promastigotas vivos foi menor em pacientes com LCD tanto inicial como tardia, quando comparada a pacientes com LC. A adição de IL2 em altas concentrações a cultura de células permitiu que os linfócitos dos pacientes com LCD proliferassem em resposta ao estímulo com promastigotas vivos	A gênese das lesões na LCD se relaciona em parte a falta de IL-2 mas não em sua utilização.
1991	Martinez-Arends e cols(351)	Venezuela	Imuno-histoquímica	LC, LCD e LM	Não específica do	LCD tenderam a ter maior proporção de células com o fenótipo CD45RO+, CD45RA+ e CD4+CD45RA+. Da mesma forma Granulomas de LCD tenderam a ter um aumento de células T virgens CD4+CD45RA+ e baixos números de células CD4+CD45RA-	Nas lesões de LCD existe uma menor razão entre de células T de memória/virgens que na LC e na LM.
1990	Pisa e cols(352)	Etiópia	ELISA	LC, LCD, MH, CS	Não específica do	O soro de pacientes com LCD e MH apresentavam altos títulos de TNF- α estatisticamente maiores de os do CS. Na LC não foi possível observar níveis de TNF- α maior que os CS.	Os níveis séricos de TNF- α são maiores em formas de leishmaniose que não apresentam resposta imune celular.

Continua

1990	Avila e cols(353)	Venezuela	ELISA	LCD, LC, LM, CS, infecção por <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> e doenças inflamatórias	Não específica do	É descrito método para confecção de ELISA contra o epítipo Galactose α 1-3-manose de glicofosfolípidios de <i>L.(L.) mexicana</i> e <i>L.(V.) braziliensis</i> . É positivo em 83% dos soros de LC, 69% na LM e em 89% na LCD mas também é positivo nas infecções por <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i>	Sugere a presença comum de oligossacarídeo altamente imunogênico em membros da família Trypanosomatida .
1990	Mengistu e cols(354)	Etiópia	Imunoblotting	LC e LCD	<i>L. (L.) aetiopica</i>	O soro dos pacientes reagiu com antígenos provenientes de <i>L.(L.) aetiopica</i> cultivado de suas lesões. Pacientes com LCD reagem a antígenos entre 18 e 50 kilodaltons e na LC houve baixa reatividade abaixo de 50kD. Parasitas derivados dos diferentes pacientes tinham padrões de expressão dos antígenos.	Padrões de antígenos reconhecidos pela LC e pela LCD foram diferentes e este padrão não foi explicado por expressão diferentes antígenos pelos promastigotas das diferentes formas.
1989	Melby e cols(355)	Vários países	Proliferação e produção de IFN- γ por diferentes antígenos, ELISA, Imunoblotting de duas dimensões	LC em melhora ou curada, LM, LCD, CS e expostos a <i>L. (L.) donovani</i>	<i>L. (V.) panamensis</i> , <i>L. (L.) mexicana</i> , <i>L. (V.) brasiliensis</i> , <i>L.(L.) major</i> , <i>L.(L.) donovani</i>	Após estímulos por antígenos de <i>L. (L.) donovani</i> separados por Imunoblotting em duas dimensões foi medida a proliferação celular e a produção de IFN- γ . Na LC curada e na LM houve boa produção de IFN- γ e proliferação celular a uma variedade de antígenos. Na LCD a produção de IFN- γ e a proliferação foram ausentes ou limitadas a alguns antígenos.	Os pacientes com LCD apresentam resposta baixa ou ausente a uma variedade de antígenos <i>L.(L.) donovani</i>
1988	Akuffo e cols(356)	Etiópia	Proliferação linfocitária após estímulo com promastigotas (PROM-LC, PROM-LCD ou uma mistura dos dois)	LCD inicial, LCD de longa evolução, LCD em remissão e LCL	<i>L. (L.) aetiopica</i>	Os pacientes com LCD de longa evolução respondiam menos a ambos os promastigotas. A resposta aos antígenos foi PROM-LCD < mistura < PROM-LC. Pacientes com LCD em remissão responderam de forma semelhante a pacientes com LC. Pacientes com LCD tiveram alguma resposta a antígenos derivados de pacientes com LC.	Não parece haver uma inabilidade inata a responder ao antígeno de Leishmania, mas uma não responsividade prolongada mas transitória que está associada ao processo patológico.

Continuação

1988	Castes e cols(357)	Venezuela	Proliferação linfocitária, ensaios para a produção de IL-2, IFN- γ e imunomarcagem de PBMC para CD2, CD4, CD8 e CD20. Após estímulo com antígeno de <i>L. (L.) mexicana</i> ou PHA	LC, LM, LCD e CS	Não reportado	No grupo de LCD houve menor proliferação linfocitária que na LC ao antígeno, mas não a PHA. Menor expressão de IL-2r na LCD que nos grupos de LC, LM e CS e de IL-2 que na LC e LM. Menor quantidade de células da linhagem Macrófago-monócito na LCD. Somente dois pacientes estudados para a produção de IFN- γ , mas com níveis muito baixos.	Linfócitos de pacientes com LCD proliferam menos em resposta ao antígeno de <i>Leishmania</i> e produzem menos IL-2 além de expressar menor IL-2r em suas PBMC.
1987	Akuffo e cols(358)	Etiópia	Proliferação linfocitária, ensaios para IL-2 e IFN- γ após SLA-LC, SLA-DCL e PHA	LCD, LCD tratada, LC e controle	Endêmica para <i>L. (L.) aetiopica</i>	Todos os doentes responderam aos antígenos com produção de IFN- γ e IL-2 após estímulo com PHA. Os grupos LC e LCD responderam de forma mais intensa ao SLA-LC que ao SLA-LCD. O paciente com LCD tratada foi capaz de responder de forma semelhante ao SLA-LC e ao SLA-LCD.	Na LCD podem haver fatores associados ao parasita infectante que desligam as funções imunológicas no hospedeiro. A habilidade de produzir IL-2 ao SLA-LCD pode estar associada a cura neste paciente.
1987	Castes e cols(359)	Venezuela	Proliferação linfocitária ao antígeno de <i>L(L.) pifanoi</i> , a ConA, PHA	LC, LM, LCD e CS	Não reportado	A adição de indometacina aumentou a resposta mitogênica a PHA, mas não ao antígeno de <i>Leishmania</i> .	A anergia observada na LCD não é decorrente do envolvimento de prostaglandinas
1987	Nilsen e cols(360)	Etiópia	Imuno-histoquímica	LCD e LC	Endêmica para <i>L. (L.) aetiopica</i>	Tanto linfócitos supressores/citotóxicos (Leu2a+), como T auxiliares (Leu3a+b) estiveram mais presentes na LC que na LCD. HLA-DR estava presente nos queratinócitos epidermicos acima de lesões de LC mas não nas de LCD. Receptores de IL-2 (TAC+) estiveram mais presentes em granulomas de LC que LCD. Células IL-2+ eram encontradas em grupos na LC mas espalhadas e isoladas na LCD.	O defeito imunológico na LCD estaria relacionado a vários mecanismos e não só á falta de IL-2. O padrão de expressão IL-2r foi diferente entre a LCD na Etiópia e americana.
1987	Rada e Cols(361)	Venezuela	Proliferação linfocitária e produção de IFN- γ após estímulo por promastigotas	LC, LCD e LM	Não reportado	Baixa produção de IFN- γ e baixa proliferação linfocitária após estímulo antigênico em paciente com LCD.	A produção de IFN- γ e a proliferação linfocitária são diminuídas da na LCD.

Continua

			mortos				
1985	Modlin e cols(362)	Venezuela	Imuno-histoquímica	LC, LCD e CS	Não reportada	Foi realizada marcação com Leu 4, Leu 2a, Leu 3a, IL2 e IL2r. IL-2 foi encontrada em menor quantidade na LCD. O número de células positivas para IL2r foi semelhante. Células T6+ foram maiores na LC que na LCD e nos CS. A relação entre as células leu2a/3a foi semelhante entre as formas.	Na LCD, a produção in situ de IL-2 parece estar inibida, apesar de células potencialmente responsivas estarem presentes.
1984	Peterse n e cols(363)	República Dominicana	Proliferação linfocitária após PHA, ConA ou SLA	LCD e CS com IDRM-neg e CS com IDRM-pos	Não reportada	Linfócitos de pacientes DCL foram cocultivados com monócitos de CS e linfócitos de CS foram cocultivados com monócitos de pacientes com LCD. A proliferação linfocitária ao SLA foi maior em CS IDRM+ que em CS IDRM- e que na DCL. A proliferação após ConA e PHA foi semelhante entre os grupos. Linfócitos de pacientes com DCL com monócitos de CS proliferaram em resposta ao SLA. Já Linfócitos de CS IDRM+ com monócitos de DCL não proliferaram após SLA.	A proliferação linfocitária ao antígeno de Leishmania é abolida quando a origem dos monócitos é de pacientes com LCD.
1984	Castes e cols(364)	Venezuela	Proliferação linfocitária após estímulo com o antígeno de <i>L. (V.) braziliensis</i> em diferentes condições. Medida dos complexos imunes circulantes	LC, LM, LCD, CS	Não reportada	Pacientes com LCD tiveram menor índice de proliferação quando comparados a pacientes com LM. O antígeno de <i>L. (L.) braziliensis</i> induziu a supressão da proliferação mais intensamente nos pacientes com LCD que nos LM e CS. Na LCD existiu maior quantidade de complexos imunes que nos CS.	Pacientes com LCD tiveram menor resposta proliferativa linfocitária e tiveram suas respostas diminuídas pelo antígeno LBY. Além disso tiveram maior quantidade de complexos imunes circulantes.
1983	Castes e cols(115)	Venezuela	Proliferação linfocitária após PHA, ConA, antígenos de <i>Leishmania</i> e <i>T cruzi</i> .	LC, LM, LCD e CS	Não reportada	Na LCD a proliferação a ConA e PHA não estava diminuída. A proliferação após antígenos de <i>Leishmania</i> foi menor na LCD que na LC e na LM. A proliferação	Na LCD existe defeito na resposta ao antígeno de <i>Leishmania</i> in vitro.

Continuação

						após estímulo com antígeno de <i>T cruzi</i> também foi menor na LCD que na LM.	
1982	Peterse n e cols(365)	Repúb lica Domini cana	Proliferação linfocitária a estímulos após estímulos antes e após passagem por lã de Náilon ou adição de indometacina	LC, LCD e CS	<i>L. (V.) panamens is, L. (L.) major</i> e alguns não reportados	Em PBMC não fracionadas a resposta ao antígeno de Leishmania foi diminuída na LCD, mas estava preservada após PHA e ConA. Após passagem por lã de Náilon ou adição de indometacina a resposta ao antígeno de Leishmania foi elevada na LCD.	Prostaglandinas e a presença de células aderentes supressoras pode estar envolvida na anergia antígeno específica na LCD.
1970	Bryceso n(366)	Etiópia	Níveis plasmáticos de imunoglobulina s, DHT após transferência de leucócitos	LC, LCD ativa, LCD curada e CS	Não reportada, área de <i>L. (L.) aetiopica</i>	Os níveis plasmáticos normais de IG na LCD, embora alguns tiveram aumento de IgA. Os sujeitos tiveram teste tuberculínico, lepromanínico e Kvein negativos. A transferência de leucócitos de doadores sensíveis ao antígeno de Leishmania foi capaz de positivar temporariamente a IDRM.	Na LCD a hiporresponsivid ade imune parece ser antígeno específica e restrita a imunidade mediada por células.

Conclusão

5 DISCUSSÃO

5.1 PRINCIPAIS ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS DA LCD ENCONTRADAS NA LITERATURA

O parasito tem grande importância do desenvolvimento da LCD, sendo que, apesar de diversas espécies poderem causar a doença, como já dito apenas 4 espécies são responsáveis pela grande maioria dos casos reportados(36). Além disso, mesmo em espécies tipicamente causadoras da LCD algumas tem maior propensão a desenvolver esta forma. Em estudo de área endêmica para *L. (L.) aetiopica* Akuffo e colaboradores mostraram tanto pacientes com LCD como pacientes com LC respondem menos ao SLA-LC que ao SLA-LCD, sendo que após o tratamento bem sucedido de um paciente com LCD este passou a responder ao SLA-LCD(358). Em outro estudo, o mesmo autor mostrou que PBMC tendem a produzir IL-10 quando estimuladas com promastigotas derivadas de pacientes com LCD (PROM-LCD) mas IFN- γ quando estimuladas com promastigotas derivadas de pacientes com LC (PROM-LC). Surpreendentemente, mais mRNA de IFN- γ foi produzido em resposta a PROM-LC que a PROM-LCD independente se as PBMC foram derivadas de pacientes com LCD, LC ou controles saudáveis(CS)(337). Em outro estudo, Osland mostrou que polipeptídios de *L. (L.) aetiopica* tem reação cruzada contra anticorpos da classe IgG e IgM, sendo que pacientes com LCD produziram anticorpos da classe IgM contra IgG, mas que estes quase não foram detectados no soro de pacientes com LC(336).

Entretanto, existem evidências de que fatores ligados ao hospedeiro tem também importância no desenvolvimento da doença. Uma destas está na relação entre a doença e o antígeno leucocitário Humano(HLA), sendo que um estudo mostrou que pacientes com HLA-A11, B5 e B7 tem um risco relativo de 7400, 4328 e 3002 de desenvolver LCD, sendo que não foi observada relação entre LC e o HLA neste estudo(349).

Além disso, pacientes com LCD parecem responder a diferentes antígenos do parasito que pacientes com outras formas da doença. Mengistu e colaboradores utilizando antígenos derivados dos próprios pacientes mostraram, que pacientes com LCD responderam a antígenos entre 18-50kd, enquanto pacientes com LC

responderam pouco a antígenos com menos de 50kd(354). Em outro estudo foi demonstrado que o soro de pacientes com LCD tinha anticorpos predominantemente contra o antígeno parasitário hsp83, já em pacientes com LC e LM predominavam anticorpos contra o hsp70(339). Silveira estudando casos causados por *L. (L.) amazonensis* mostrou que PBMC de pacientes com LCD proliferavam menos ao antígeno cru de *L.(L.) amazonensis* e produziam menos IFN- γ em resposta ao antígeno P8 quando comparado a pacientes com LC(367). Outro estudo utilizando antígenos de *L. (L.) donovani* separados por eletroforese bidimensional mostrou que pacientes com LCD além da baixa resposta aos antígenos, respondem a uma menor variedade de antígenos que pacientes com LC ou LM(368).

A pesar de a LCD ter sido relatada em situações de imunossupressão como doenças e uso de medicações(38, 41, 43, 46, 136), estudos experimentais tem mostrado que na LCD existe uma diminuição da resposta imune que é específica ao antígeno de Leishmania. Em estudo clássico, Bryceson mostrou que pacientes com LCD tem níveis IgG semelhantes a outras formas da doença e a controles saudáveis, embora houvesse elevação de IgA. No mesmo estudo estes pacientes responderam normalmente aos antígenos tuberculínico e da hanseníase, e apresentavam teste de Kvein negativo(369).

A proliferação linfocitária aos mitógenos como ConA e Fitohemaglutinina (PHA) também não se mostrou diminuída na LCD em um estudo, embora a proliferação a antígenos de Leishmania e ao antígeno de *T. cruzi* estivesse diminuída(115). Da mesma forma Barral e colaboradores mostram que os linfócitos de todos os pacientes com LCD proliferaram em resposta aos mitógenos PHA e Mitogêno de Pokeweed (PWM), embora a proliferação de pacientes com LCD polar tenha sido menor(122). Entretanto, a proliferação não ocorreu em resposta aos antígenos de Leishmania(122). Em consonância com estes achados Coutinho e colaboradores mostraram que PBMC de paciente com LCD proliferavam e produziam IFN- γ após estimulação com ConA e antígeno de *T. gondii* mas não o faziam após a estimulação com antígenos de *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) brasiliensis*(324).

Outra característica que se discute na LCD se refere a reversibilidade da disfunção celular. Isso foi sugerido por Akuffo e colaboradores quando mostraram, que pacientes com LCD em remissão respondiam com proliferação linfocitária ao

estímulo com PROM-LC e PROM-LCD de forma semelhante a pacientes com LC(356). Uma das conclusões dos autores é que não parece haver uma inabilidade inata para responder ao antígeno de Leishmania, mas sim uma não responsividade prolongada mas transitória que está associada com o processo patológico, sendo esta “anergia” presente na LCD modificável(356). Tratamento já se mostrou capaz de positivar a IDRM na LC(330, 370) e também causar o retorno das funções do LT com proliferação linfocitária e produção de IL-2, IFN- γ em um paciente e IL-4 no outro(344).

A composição do infiltrado inflamatório é também alterada na LCD. Em estudo brasileiro, Xavier e colaboradores demonstraram, que pacientes com LCD apresenta menor número de células de Langerhans CD1a+ que pacientes com LC(329), isso também foi observado em outro estudo na Venezuela(332). As células CD1a+ tendem a ficar confinadas a epiderme em pacientes com LCD, sendo que durante o tratamento elas passam a ocupar a epiderme, derme superior e algumas áreas inflamatórias residuais(334). Células CD8+ e NK também tem distribuição difusa na LCD sendo que passam a se localizar em regiões de inflamação com o tratamento(334). Mesmo autor mostrou relação anormalmente baixa entre LT CD4+/CD8+ no sangue periférico que aumentou após o tratamento, passando de 0.2 para 0.96(334).

Inicialmente vistos como condutores da resposta imune, até a década de 70 os LT eram divididos em classes funcionais de acordo com a positividade para marcadores de superfície CD8+ e CD4+(224). Entretanto a partir do trabalho de Parish foi demonstrada uma relação inversa entre a imunidade mediada por células, representada pela reação de hipersensibilidade retardada a um antígeno aplicado intradermicamente, e a humoral, representada pelos títulos de anticorpos específicos contra o antígeno(225). Posteriormente foram identificadas duas subpopulações de LT CD4+: Th1 e Th2. Os linfócitos Th1 seriam induzidos pela expressão de IL-12 e IFN- γ , com produção de IFN- γ e IL-2 tendo função importante na imunidade contra patógenos intracelulares como a Leishmania(224). Já os LT Th2 seriam induzidos primariamente pela IL-4 com a produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 estando relacionados a imunidade contra helmintos e ao desenvolvimento de condições atópicas ou alérgicas(224).

Além da característica diminuição da resposta imune celular com negatividade da IDRM, pacientes com LCD apresentam altos títulos de anticorpos específicos contra *Leishmania*, frequentemente acima de 1/4800(371). Caceres-Dittmar mostraram que pacientes com LCD tem preponderância das citocinas IL-4, IL5 e IL-10 nas lesões, enquanto apresentam baixa ou nenhuma expressão de IL-6, TNF- α e IL-1 β (230). Em estudo brasileiro Bomfim e colaboradores mostraram após estímulo com o antígeno de *Leishmania*, PBMC de pacientes com LCD expressavam principalmente IL-2, IL-4 e IL-10, mas não expressavam IFN- γ . Após tratamento com remissão temporária houve aumento de IFN- γ e baixa produção de IL-10. Após o relapso, apesar de haver diminuição na produção de IFN- γ os níveis de IL-10 mantiveram-se baixos(342). Silveira e colaboradores também mostraram que pacientes com LCD apresentam maior expressão de IL4 e IL-10 nas lesões e em sangue periférico(88). Os níveis de IgE total e IgE específica também se mostraram elevados na LCD, o que poderia estar relacionada a uma estimulação da resposta imune Th2(331).

Das citocinas Th1 uma das mais estudadas na LCD é o IFN- γ , sendo sua expressão baixa em PBMC após estímulo com antígeno de *Leishmania*(325, 342). O surgimento desta forma de LTA já foi associado a presença de um defeito específico na produção de IFN- γ em resposta a antígeno, mesmo que os níveis desta citocina encontrassem-se sistemicamente elevados no caso estudado(338). Da mesma forma a produção de IFN- γ a estímulo antigênico tem sido relacionada a remissão da doença em diferentes estudos(334, 342, 344).

Outra citocina relacionada a resposta Th1 estudada na LCD é a IL-2. Em estudo utilizando imuno-histoquímica, Nilsen e colaboradores mostraram que receptores de IL-2 estavam presentes em menor quantidade nas lesões de LCD que na LC(360). Em estudo posterior, Akuffo e colaboradores mostraram, que a adição de IL-2 em altas concentrações a cultura de linfócitos de pacientes com LCD foi capaz de permitir que estes respondessem ao estímulo com promastigotas vivos(350). O mesmo autor sugeriu que a capacidade de produzir IL-2 ao SLA-LCD teve relação causal com a cura de um paciente com a doença(358). Da mesma forma relacionada a resposta TH1 a IL-12 se mostrou sistemicamente reduzida em pacientes com LCD quando comparado a pacientes com LC(311).

Além de quantitativamente diferente, a resposta imune humoral na LCD parece ser qualitativamente diferente que a observada na LC. Em humanos as imunoglobulinas G podem ser divididas em quatro isoformas. IgG1 e IgG3 são efetivas contra vírus, a IgG2 é mais efetiva contra bactérias encapsuladas já a IgG4 e IgE são efetivas contra parasitas extracelulares grandes(372). Quando comparado a pacientes com Leishmaniose visceral, pacientes com LCD tenderam a produzir mais anticorpos da classe IgG4, sendo que na LV IgG1 predomina(343). Rodrigues e colaboradores compararam a presença das diferentes isoformas de IgG contra Promastigotas inativados e estratos solúveis de Leishmania, mostrando que a LC foi dominada pela presença de IgG1, IgG2 e IgG3 e já na LCD a IgG4 foi predominante, mas IgG1 e IgG2 também estavam elevadas(341). Na LCD a resposta ao antígeno HSP83 também é dominada pela IgG4(339).

O tráfico leucocitário também tem sido estudado para explicar o desenvolvimento da LCD. O tráfico de leucócitos entre o sangue e os tecidos é fundamental para resposta imune normal e depende, entre outras coisas, da expressão de quimioatractantes nos tecidos, como as quimiocinas (373). As quimiocinas expressas nos tecidos tem importância fisiológica devido a sua especificidade: os membros da família de quimiocinas recrutam subtipos bem definidos de leucócitos e seus receptores são expressos de forma diferenciada nos diferentes tipos de leucócitos(374). Ritter e colaboradores mostraram que pacientes com LCD tem menor expressão local de (MCP-1/CCL2), sendo que predominava MIP-1 α (CCL3). O Autor argumenta que a expressão de CCL2 seria benéfica, enquanto a expressão de CCL3 estaria relacionada ao curso prolongado da doença. Tanto CCL2 como CCL3 atraem monócitos e macrófagos para o sítio de inflamação(375), entretendo CCL3 também está envolvido na migração de células NK e na interação célula T/ célula dendrítica(374). Outro estudo mostrou CCL11, classicamente associada a resposta imune Th2, está aumentada nas lesões de LCD quando comparada a lesões de LC(315).

Em outro estudo Campanelli e colaboradores, utilizado imuno-histoquímica, mostraram que pacientes com LCD tiveram menor expressão de CCR5, CCR4, CCR3, CCL17 que pacientes com LC, mas tinham expressão aumentada de CCL7. Os autores levantam a hipótese que embora o número de LT fosse escasso, é possível que CCL7 fosse responsável por atrair linfócitos Th2 para a lesão(320).

Utilizando a mesma metodologia, Dias e colaboradores mostraram que lesões de pacientes com LCD tinham expressão diminuída de CD69+ e CLA+(332). O CD69 é um receptor de membrana presente em diversas populações de LT que foi relacionado a migração linfocitária e na promoção de retenção de LT nos tecidos(376). O CLA está presente na superfície de LT, sendo relacionado também a migração destes para tecidos inflamados(377).

A citotoxicidade é alvo de intenso estudo na Leishmaniose, e esta envolve principalmente a apoptose da célula alvo, em um processo dependente ou não dependente de antígeno(378). A citotoxicidade pode ser mediada por uma variedade de células como LT CD8+, LTCD4+ e células NK(378). Na leishmaniose a citotoxicidade por células CD8+ é importante para a cura(379), mas também foi associada a lesão tecidual com ulceração(380). Em estudo *in vitro* linfócitos T CD8+ de pacientes com LCD tiveram citotoxicidade significativamente diminuída quando comparado a LT CD8+ de pacientes com LC(319).

O sistema imunológico Inato tem importante função no controle da Leishmaniose, sendo que modelos murinos tem mostrado que os receptores toll like-TLR (TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9) estão associados com a produção precoce de IFN- γ e IL-12 fundamental para o controle da Leishmaniose(313). Os TLR são sensores capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) como DNA de dupla hélice não metilado, Lipoproteínas, Lipopolisacarídeos e flagelina(381). Em recente estudo, Campos e colaboradores mostraram que TLR2 e TLR4 foram mais expressos nas formas causadas por *L. (V.) braziliensis* e TLR9 nas formas causadas por *L. (L.) amazonensis*. Os autores também mostraram que, em pacientes com doença causada exclusivamente por *L. (L.) amazonensis*, pacientes com LDC tinham menor expressão tecidual de TLR2 que pacientes com LC(309). Em outro estudo a estimulação de TLR2 com LPG ou Pam3Cys foi capaz de recuperar a citotoxicidade, proliferação e produção de IFN- γ em LT disfuncionais de pacientes com LDC(319).

Por outro lado, a proteína quinase dependente de RNA de dupla hélice (PKR) e IFN do tipo 1 foram mais expressos em pacientes com LCD que em pacientes com LC de acordo com trabalho de Vivarine e colaboradores(318). Em mesmo estudo autores mostraram que a adição de IFN- α a macrófagos murinos infectados com *L. (L.) amazonensis* esteve relacionada ao aumento da carga parasitária(318). O autor

argumenta que os receptores reconhecedores de padrão como TLR2 e TLR4 contribuem para a ativação do PKR e que a sinalização do PKR leva a expressão de IFNs do tipo 1, e que, ativação dos IFN do tipo um estaria associada a maior carga parasitária contribuindo para a doença causada por *L. (L.) amazonensis*(318). A expressão de IFN I já foi associada a sinalização por TLR2 e TLR4 em outros estudos(382). Desta forma ainda não é possível definir com segurança o papel destes receptores na patogênese da LCD.

Uma das primeiras células do sistema imune inato capaz de produzir IFN- γ e TNF- α em doenças causadas por protozoários é a célula NK(313). Aumento de células NK CD16+CD56+ no sangue periférico após o tratamento bem-sucedido de LCD foi reportado por Pereira e colaboradores e veio associado a aumento e monócitos proinflamatórios CD14+CD16+. Linfócitos CD56+ também foram encontrados em lesões em processo de cura, o que sugeriu a infiltração de células NK nestas lesões(322). Carrada e colaboradores também mostraram que a IL-18, que está associada conjuntamente a IL-12 na atividade de células NK, foi produzida em menor quantidade na LCD após estímulo com LPS(327). A IL-15, que é citocina ponte entre os sistemas imunes adaptativo e inato, também se mostrou diminuída na LCD(327).

Os células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), originalmente descritas como um subgrupo de leucócitos derivados de células mieloides da medula óssea que circulam no sangue e povoam os tecidos como macrófagos durante a inflamação(383), também parecem ser importantes na fisiopatogênese da LCD. A ativação da Óxido nítrico sintetase (iNOS ou NOS2) com a produção de óxido nítrico por macrófagos durante o processo de fagocitose se mostrou importante na erradicação de parasitas intracelulares em modelos murinos. Diversos estudos tem mostrado a presença de iNOS em lesões de LC(384). Em estudo utilizando imunohistoquímica Qadoumi e colaboradores mostraram que a expressão de iNOS é intensa em lesões de pacientes com LC, mas que apenas uma pequena quantidade de células foram positivas para esta proteína na LCD(333). Em estudo venezuelano, Diaz e colaboradores mostraram que a Óxido nítrico sintetase induzível é significativamente menos expressa em granulomas de LCD que dos de LC(328).

Células do SFM estão envolvidas no início e controle da resposta imune na LCD. Petersen e colaboradores, em estudo clássico, mostraram que a passagem de

PBMC por lã de Náilon, foi capaz de restaurar a resposta proliferativa ao antígeno de Leishmania(365). O autor argumenta que as células depletadas com este procedimento são monócitos, embora outras populações possam ser afetadas(365). Mesmo autor mostrou que linfócitos de pacientes com LCD foram capazes de apresentar resposta proliferativa ao antígeno de Leishmania quando seus próprios monócitos foram substituídos por monócitos de controles saudáveis. Por outro lado, linfócitos de sujeitos expostos com IDRM positiva perderam a capacidade proliferativa quando expostos a monócitos de pacientes com DCL(363).

Este papel no controle da diferenciação de LT pode ser explicado pela ação de moléculas co-estimulatórias expressas em células do SFM, de acordo com modelo já explicado na introdução. Em estudo de polimorfismos no gene do CTLA-4, pacientes com LCD tiveram maior frequência o genótipo A/G+49, enquanto pacientes com LC apresentavam com maior frequência o genótipo A/A+49(323). Em outro estudo a presença da molécula co-estimulatória CD86 foi maior em monócitos CD14+ de sangue periférico de pacientes com LCD que em pacientes com LC(327). O autor argumenta que a expressão de CD86 estaria associada a resposta imune Th2, não sendo possível entretanto definir se alteração é causa ou consequência da mesma(327). Em outro estudo linfócitos CD8+ de pacientes com LCD a reversão de quadro de disfunção celular esteve associada a diminuição da expressão de PD-1(319).

A disfunção celular na LCD também foi atribuída a aumento no número de células T regulatórias FoxP3+ nas lesões(321). A proporção de células T virgens CD4+CD45RA+ em relação a células T de memória CD4+CD45RA- também se mostrou aumentada em pacientes com LCD de acordo com estudo utilizando imunohistoquímica realizado na Venezuela(351). Tapia e colaboradores levanta a hipótese de que este relativo aumento de células T virgens e possivelmente de LT Th2 poderiam estar associados a alterações em moléculas de adesão como ICAM1(346).

Quadro 6 - Principais alterações Imunológicas da Leishmaniose difusa.

Alterações	referências
Pacientes com LCD respondem a diferentes antígenos que pacientes com outras formas da doença	(335, 339, 354, 368)
A disfunção imune na LCD é antígeno específica sendo que linfócitos dos pacientes proliferam e resposta a mitógenos.	(115, 324, 366, 385)
A Disfunção imune da LCD parece ser transitória e associada ao processo patológico	(344, 356, 370, 386)
Pacientes com LCD apresentam atividade Th2 com altos níveis de anticorpos específicos circulantes, elevação dos níveis de IgE específica e produção predominante de anticorpos específicos da classe IgG4. Citocinas Th2(IL-4 e IL-10) tanto sistemicamente como nas lesões.	(88, 230, 302, 342, 387)
Existe baixa produção de IFN- γ em resposta ao antígeno na LCD. A cura da LCD está relacionada a produção de citocinas Th1 como IFN- γ e IL-2.	(325, 334, 338, 342, 358, 360, 388)
Nas lesões de LCD moléculas e receptores quimiotáticos CCL3, CCL11 e CCL7 estão aumentados, enquanto CCL2, CCR5, CCR4, CCR3 e CCL17 estão diminuídas.	(315, 320, 389)
Linfócitos T CD8+ de pacientes com LCD apresentam menor citotoxicidade in vitro que os de pacientes com LC.	(390)
Pacientes com LCD tem menor expressão tecidual de TLR2 e sua estimulação com Pam3Cys ou LPG foi capaz de recuperar as funções efectoras de LT CD8+.	(309, 390)
Citocinas relacionadas ao sistema imune inato IL-18 e IL-15 foram produzidas menor quantidade na LCD.	(327)
A óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) é menos produzida em pacientes com LCD.	(328, 333)
A molécula co-estimulatória CD86 é mais expressa em pacientes com LCD . Aumento da expressão de PD-1 e polimorfismos no gene de CTLA4, também estão possivelmente envolvidos na imunopatogênese da LCD.	(319, 323, 327)
Na LCD existe aumento relativo de células T regulatórias FoxP3+ e LT CD4+ virgens.	(351, 391)
Mediadores lipídicos estão envolvidos na patogênese sendo que na LCD existe maior expressão de Receptor 2 de prostaglandina E a resolvina D1 está aumentada no plasma.	(310, 311)

Finalmente o balanço de mediadores lipídicos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios também são estudados como possível fator que influencia no desfecho de doenças infecciosas(392). As Resolvinas são um grupo de mediadores lipídicos endógenos que tem papel na resolução da inflamação(393). Outro grupo de mediadores lipídicos, as prostaglandinas podem diminuir respostas imuno-inflamatórias causando persistência de infecção ou ainda influenciar respostas protetivas em infecções como a hanseníase, por exemplo(392). Em estudo clássico, Petersen e colaboradores mostraram que PBMC de pacientes com LCD tiveram resposta proliferativa ao antígeno de *Leishmania* restaurada após a adição de indometacina(365), o que não foi confirmador por estudo posterior(359). A indometacina é droga que é inibidora da Cicloxigenase, enzima responsável pela síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico(394). Recentemente, França e Costa mostraram que mRNA do “receptor 2 de prostaglandina E” é mais expresso em lesões de LCD que de LC(311). A resolvina D1 também esteve aumentada no plasma de pacientes com LCD quando comparado a pacientes com LC, sendo esta possivelmente associada ao ambiente antiinflamatório presentes na LCD(310).

As principais alterações imunológicas da Leishmaniose difusa encontradas nos estudos estão demonstradas na tabela 8.

5.2 A FORMA CLÍNICA DE LEISHMANIOSE

Nosso paciente apresentava placa eritematosa não ulcerada de crescimento progressivo em região de dorso nasal a qual surgiu um mês após viagem a região amazônica.

A morfologia e distribuição das lesões é o principal fator na classificação das formas clínicas de Leishmaniose tegumentar. A pesar de muitas infecções serem subclínicas, o primeiro sinal da infecção é tipicamente uma pequena mácula eritematosa que se desenvolve um tempo variável após a picada do vetor e evolui para uma pápula e então para um nódulo e finalmente para uma úlcera, que se desenvolve na lesão característica da LC(15).

A LDS por sua vez é caracterizada por múltiplas lesões acneiformes, papulares, nodulares e ulceradas em duas ou mais regiões do corpo(91, 93) e que se disseminam rapidamente(em algumas semanas)(122). No caso do sujeito do estudo, observamos uma lesão não ulcerada o que é um aspecto que fala contra LC. A apresentação clínica observada não é compatível com LDS já que além de a lesão ser localizada, a lesão em placa não está entre as morfologias descritas na LDS.

A forma difusa é caracterizada por placas e nódulos infiltrados não ulcerados que ao longo do tempo podem atingir grandes áreas da pele(122-124, 371) e podem ser localizados na fase inicial da doença(8). A Lesão clínica é, portanto, compatível com um caso inicial de Leishmaniose difusa tanto pela morfologia da lesão, placa eritematosa não ulcerada, como pela história de lenta evolução.

Em nosso caso pudemos identificar a *Leishmania (L.) amazonensis*. A depender da espécie de *Leishmania* responsável pela infecção, o paciente terá maior ou menor possibilidade de desenvolver uma determinada forma clínica. Enquanto, em nosso meio, a espécie mais frequentemente associada LC, LDS e LM é a *Leishmania (V.) braziliensis*(91). A LCD, por outro lado, é causada pela *Leishmania (L.) Amazonensis* (133, 219, 395). A identificação da espécie de *Leishmania* pode ser feita com alta sensibilidade e especificidade através de reação em cadeia da polimerase, já que a avaliação microscópica não pode definir a espécie com segurança (396, 397). A identificação no caso *Leishmania (L.) amazonensis*, o diagnóstico de LCD.

É também muito discutido na literatura o comportamento dos exames complementares nas diferentes formas da Leishmaniose(88). O teste de Montenegro, por analisar a resposta de hipersensibilidade celular retardada, é especialmente importante neste aspecto(88). Ele é tipicamente negativo na Leishmaniose difusa e positivo nas formas localizada, disseminada e mucosa(88). Em uma série de casos brasileiros, dos 6 pacientes analisados, todos tinham reação de Montenegro negativa, embora ocasionalmente 3 dos 6 pacientes apresentassem alguma reação fraca(122). A negatividade da reação ao antígeno de Montenegro em nosso paciente, portanto, reforça o diagnóstico de Leishmaniose difusa.

A IFI de nosso paciente foi negativa. Assim como outros testes sorológicos a IFI e o ELISA tem relação com os níveis de anticorpos no sangue do paciente(173). Entretanto, existe grande variação de acurácia diagnóstica a depender da técnica

utilizada(7). A espécie causadora da doença também parece ser um aspecto importante a ser considerado(179). Estudo com *Leishmania (L.) amazonensis* mostrou altos títulos de anticorpos quanto medidos por Imunofluorescência indireta(88) e elevados títulos de IFI também foram observados em séries de casos de pacientes com Leishmaniose difusa no Brasil(122). Entretanto, também existe série de casos de Leishmaniose difusa em que a Imunofluorescência indireta foi negativa em todos os acometidos(173). Em estudo utilizando o antígeno de *Leishmania (L.) amazonensis* para teste de imunofluorescência indireta, foi demonstrado que pacientes com infecção por *Leishmania (V.) braziliensis* apresentam títulos de anticorpos mais elevados do que aqueles infectados com *Leishmania (V.) guyanensis*(179). O autor discute que é possível que o fato de não se utilizar antígenos homólogos a espécie pode estar influenciando o desempenho diferente do teste a depender da espécie infectante(179).

As diferentes propriedades do teste a depender do antígeno também é um tópico discutido em outro estudo, sendo que testes que utilizam o antígeno de *Leishmania (V.) braziliensis* tiveram sensibilidade de até 95% e que o antígeno de *Leishmania (L.) amazonensis* apresenta grande número de reações cruzadas principalmente com a doença de Chagas e a Paracoccidiodomicose(178).

Aparentemente a resposta imune Th2 é importante na Leishmaniose causada por *Leishmania (L.) amazonensis*, com a produção de com a produção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10(398). Hashigushi e colaboradores mostraram uma alta resposta por anticorpos em pacientes com Leishmaniose difusa utilizando o teste rápido de Leishmaniose visceral rK39(94). Este teste sorológico, que envolve imunocromatografia, é largamente utilizado na Leishmaniose visceral(399), mas se mostrou positivo também na Leishmaniose disseminada e difusa em um estudo(94).

Por este motivo apesar de na Leishmaniose causada por *Leishmania (L.) amazonensis* a resposta imune humoral ser aparentemente importante, questões intrínsecas aos métodos sorológicos utilizados parecem estar relacionadas aos achados encontrados na literatura com relação a positividade dos testes sorológicos na forma difusa da doença, como descritos por Silveira 2004 e Kar 1995(88, 173). Desta forma a negatividade da imunofluorescência indireta no caso não reforça e nem afasta a hipótese de Leishmaniose difusa.

Os histopatológicos da lesão mostraram a presença de infiltrado histiocitário que se estendia da derme papilar até a derme profunda, em um dos exames foi ainda observado focos espaços de infiltrado linfoplasmocitário que se adensaram no limite profundo da lesão. Estes achados histopatológicos são compatíveis com a reação exsudativa celular de acordo com o descrito por Magalhães e cols.(400), ou a resposta macrofágica intacta na classificação de Riddley e cols.(217). A ausência de células gigantes multinucleadas também reforça o diagnóstico de LCD no caso assim como descrito por Bittencourt(221). A ausência de necrose favorece a classificação do caso como LCD polar(221, 385), entretanto, há que se discutir a intensidade do infiltrado linfocitário que é mínimo na LCD(222), mas pode ser moderada(221) ou até mesmo apreciável(220). Desta forma, o histopatológico reforça o diagnóstico de LCD, embora é necessária a correlação com os dados clínicos e imunológicos para a correta classificação(221).

A evolução clínica do sujeito do estudo com necessidade de múltiplos cursos de tratamento além da associação de drogas para atingir remissão é típica de um caso de Leishmaniose difusa. A relação entre o tratamento e a forma clínica da Leishmaniose(75). A recorrência da Leishmaniose após o tratamento é classicamente chamada de Leishmaniose recidiva cútis(401), também sendo referida como metaleishmaniose, Leishmaniose lupoide e Leishmaniose cutânea tardia(402). Estudo brasileiro mostrou que o desenvolvimento desta forma tem sido primariamente associado a falha terapêutica, podendo seu desenvolvimento ser prevenido pelo tratamento com antimonial pentavalente(401). A forma cutânea localizada pode em alguns casos curar sem tratamento, já a forma mucosa da doença é de difícil tratamento raramente curando espontaneamente(15). A Leishmaniose cutâneo difusa, entretanto, está tipicamente associada a uma baixa resposta ao tratamento tradicional com relapsos frequentes(94). Em nosso paciente é possível que o tratamento precoce tenha permitido a remissão completa da doença por longo período, sendo que na data da confecção desta dissertação em janeiro de 2019, não havia recidiva da doença. Entretanto, é ainda possível que o relapso venha a ocorrer, sendo descrito relapso da doença muitos meses após interrupção do tratamento com diferentes drogas(334, 403, 404).

5.3 ANÁLISE DOS ACHADOS *IN VITRO* E *EX VIVO*

A resposta imune na Leishmaniose foi grandemente estudada em modelos murinos e utilizando a *Leishmania (L.) major*(405). De acordo com o paradigma clássico, o desenvolvimento de doença estaria relacionado a um perfil de citocinas Th2 e cura a um perfil Th1(406). Entretanto, em humanos e em infecções experimentais com *Leishmania (L.) amazonensis*, este paradigma não é suficiente para explicar a patogênese da doença(405, 407). Em um estudo com camundongos BALB/c mostrou que diferentemente do que ocorre com a *Leishmania (L.) major*, a infecção por *Leishmania (L.) amazonensis* tem uma resposta mista Th1/Th2 com produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α mas também de IL-4, IL5, IL-6 e IL-10(398). Em camundongos C57BL/10, também tem sido sugerido que a susceptibilidade a *Leishmania (L.) amazonensis* está relacionada mais a uma ausência de uma resposta Th1 do que a presença de uma resposta Th2(408). Este argumento que tem sido corroborado por estudos em diferentes cepas de camundongos mostrando que a patogenia da doença não requer a presença de IL-4(409, 410). Jones e cols. em um de seus trabalhos argumentam que, no caso de doença causada por *Leishmania (L.) amazonensis*, não é a IL-4 a responsável pela ausência de resposta da IL-12 (citocina classicamente chave para o surgimento de resposta imune TH1) atribuindo este fenômeno a fatores mediados pelo patógeno)(409). Estudo experimental propõe que a *Leishmania (L.) amazonensis* induziria um estado “Semiativado” de células dendríticas, o que seria responsável por um fenótipo Th1 similar(411). A *Leishmania (L.) amazoensis* também é capaz de alterar a diferenciação de células dendríticas humanas a partir de monócitos o que resulta em produção diminuída de IFN- γ e sobrevivência do parasito *in vitro*(412).

A literatura prévia, portanto, mostra claros indícios de que o paradigma Th1/Th2 é insuficiente para explicar a patogênese da Leishmaniose difusa, sendo necessários mais estudos para o melhor esclarecimento dos aspectos imunológicos envolvidos. Estes estudos em humanos são, entretanto, limitados pela raridade da doença e nós tivemos a oportunidade de estudar as moléculas intracelulares e de superfície que estão possivelmente envolvidas na gênese da Leishmaniose difusa.

No presente estudo, após a estimulação com o SLA, nós observamos um decréscimo em linfócitos T CD4+IFN- γ + e CD8+IFN- γ +. O IFN- γ , uma citocina Th1 clássica, tem funções e padrões de expressão diferentes a depender da espécie de

Leishmania envolvida. Jones e colaboradores mostraram que ratos da cepa CH3 infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* apresentam menores níveis de IFN- γ e linfonodal que os infectados com *Leishmania (L.) major* (409). Outro estudo comparou camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania (L.) braziliensis* ou com *Leishmania (L.) amazonensis*. Os autores mostraram que os infectados com *Leishmania (L.) braziliensis* tiveram maior positividade de IFN- γ em células CD4⁺CD44⁺ linfonodais após a reestimulação com o antígeno de Leishmania, e que esta positividade esteve relacionada a cura neste modelo(413).

Em humanos, o antígeno de *Leishmania (L.) amazonensis* é um fraco indutor da produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ quando comparado ao antígeno de *Leishmania (V.) braziliensis* in vitro(414). Linfócitos T CD8⁺ também tiveram produção deficiente de IFN- γ em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* (415).

A produção in vitro de IFN- γ por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) é o melhor indicador de imunogenicidade contra *L. (L.) amazonensis* em macacos(416) e tem se mostrado uma boa indicadora de resposta vacinal contra espécies dermatrópicas de Leishmania em humanos(417). Entretanto, o IFN- γ tem papel paradoxal durante a infecção por *L.(L.) amazonensis*. Sua produção favorece a apresentação de antígeno e serve como indutor de mecanismos efetores, particularmente através da expressão da óxido nítrico sintetase induzível. Entretanto, esta citocina também induz a produção de quimiocinas que levam a migração de linfócitos T CD4⁺ e macrófagos para a lesão, passo importante na patogênese da doença(407). Consistente com a hipótese de que a produção de IFN- γ pode ter papel patogênico, o tratamento com IFN- γ aumentou a carga parasitária em macrófagos murinos infectados com *L.(L.) amazonensis*, e este aumento foi atribuído a uma maior replicação de amastigotas intracelulares(418). Da mesma forma, em camundongos B6 (suscetíveis) e deficientes de RAG(resistentes), a transferência prévia de linfócitos T regulatórios CD4⁺CD25⁺ foi capaz de inibir a produção de IFN- γ por células linfonodais e diminuiu a carga parasitária durante a infecção por *L.(L.) amazonensis*(419).

Os achados aparentemente contraditórios podem ser explicados pela cronologia da produção desta citocina no curso da doença e pelas espécies de Leishmania estudadas. Estudo em humanos em uma área de *L. (V.) braziliensis*

mostrou que apesar da produção baixa ou ausente de IFN- γ no início da doença, as PBMC de todos os pacientes com mais de 60 dias do surgimento da úlcera produziam altos níveis IFN- γ após estimulação antigênica(420).

Experimento *in vitro* com *L.(L.) amazonensis* também mostrou que PBMC de voluntários não expostos apresentam alta produção de IFN- γ 120h após exposição a formas promastigotas, apesar de a produção desta citocina ter sido baixa no início, 12hs após a exposição(421). Da mesma forma camundongos C57BL/c IFN- γ -*Knockout* são tão resistentes a *Leishmania (L.) amazonensis* como ratos selvagens nas primeiras duas semanas, entretanto, eles tem piores desfechos após este período(422). De forma similar, estudo mostrou que a produção precoce de IFN- γ foi associada com o recrutamento de linfócitos T CD4+ e contribuiu para o desenvolvimento da lesão(407). Estudos também mostraram que, apesar da maior produção de espécies reativas de oxigênio, os ratos selvagens apresentavam número de parasitas nas lesões e tamanho de lesões semelhantes aos ratos IFN- γ -*Knockout* até 8 semanas de infecção(407).

A influência do tratamento na produção de IFN- γ por PBMC é ainda controversa. Apesar de um estudo mostrar tendência a maiores produção após o tratamento(423) e outro mostrar tendência de decréscimo(420), relatos mais recentes não foram capazes de mostrar diferenças significativas entre os períodos de doença ativa e após o tratamento(233, 424).

Conjuntamente estes resultados sugerem que o IFN- γ é uma molécula importante nos estágios tardios da infecção por *Leishmania* e que está presente após o tratamento. Em nosso paciente, contrário ao resultado esperado após o período de um ano início de doença e mesmo com uma completa resposta ao tratamento, nós observamos uma diminuição de linfócitos TCD4+IFN- γ + e CD8+IFN- γ + após o estímulo com o antígeno de *Leishmania*.

Apesar de a produção de IFN- γ + por células CD8+ ser protetora, é sugerido que sua atividade citotóxica está associada a processos patológicos(425). A citotoxicidade é mediada por dois mecanismos: interação de receptores de morte celular e exocitose de grânulos(378). Estudo *in vitro* com PBMC de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada e Leishmaniose cutâneo difusa sugeriu que nestas apresentações de LTA a citotoxicidade é mediada por grânulos estando associada a expressão de Granzima B(319). A Granzima B liberada por PBMC também foi

associada a atividade citotóxica em ensaio que utilizou a liberação de ^{51}Cr (426). A produção de Granzima B parece ser parte da resposta imune específica contra *Leishmania*(426), e esta tem maior expressão em lesões cutâneas tardias do que em iniciais(427). Portanto, é surpreendente que nosso paciente apresente com diminuição da expressão de Granzima B em resposta a estimulação do antígeno de *Leishmania* mesmo em fases tardias da doença e sem lesões ativas no momento.

Os fagócitos mononucleares tem papel central no desfecho da infecção por *Leishmania*(428). É dentro destas células que a *Leishmania* se multiplica e pode sobreviver por longos períodos de tempo(428), e é a interação destas células apresentadoras de antígenos com linfócitos T que leva finalmente a produção de citocinas responsáveis pela resposta imune Th1 protetora(428, 429).

A ativação de células CD4+ e CD8+ depende de sua interação com o complexo maior de histocompatibilidade(MHC) associado ao antígeno, mas também é necessária a presença de moléculas coestimulatórias(430-432). Na ausência de moléculas coestimulatórias, os linfócitos não são capazes de responder efetivamente e se tornam anérgicos (433). Classicamente, tem-se assumido que a coestimulação produzida pela ligação do CD28 de células T com os CD80 ou CD86 das células apresentadoras de antígenos é passo necessário e suficiente para superar a anergia, entretanto, a via CD40/CD40L também parece ser importante(434).

Moléculas coestimulatórias, como CD40 e CD86, estão elevadas e parecem ser importantes na resistência contra a *L.(L.) major* e a *L.(L.) infantum*(435-437). A *Leishmania (L.) amazonensis*, entretanto, é capaz de inibir a maturação de células dendríticas com a expressão diminuída de células coestimulatórias(438, 439), com a consequente inibição da proliferação linfocitária(412, 438). Em nosso estudo, a expressão de CD40 e CD86 em monócitos após a estimulação com o SLA foi similar a encontrada no controle negativo. Desta forma, é improvável que a inibição destas vias coestimulatórias seja a explicação primária para a disfunção antígeno específica encontrada em nosso paciente.

Por outro lado, a expressão de PD-L1 em monócitos foi diferente entre cultura estimulada com SLA e o controle negativo. A proteína de morte programada 1 (PD-1) é um receptor inibitório que está primariamente presente na superfície de células T ativadas(440), ao passo que seus ligantes(PD-L1 e PD-L2) estão presentes em uma variedade de tipos celulares incluindo células apresentadoras de antígenos e

muitas células de linhagem não hematopoiéticas(441). A PD-1 age como um receptor co-inibitório durante a interação entre o a complexo antígeno/MHC e o receptor de célula T(TCR)(440, 441). Além de seu papel fisiologicamente importante na autotolerância, a PD-1 também já foi implicada em disfunção antígeno específica de linfócitos T CD8+ e CD4+ em doenças infecciosas e parasitárias crônicas, sendo este processo chamado exaustão celular(440, 442). A exaustão pode levar a perda da função efetora por afetar a produção de IL-2, IFN- γ +, TNF- α de linfócitos T, além de afetar a atividade citolítica e a degranulação de células T CD8+(270, 440). De forma diferente do que ocorre com a anergia, que é rapidamente induzida durante o primeiro encontro com o antígeno, a exaustão é progressiva ao longo do tempo (294). Além disso, na exaustão a produção de IFN- γ e a capacidade de degranulação são perdidas posteriormente, quando o processo está avançado(294, 443). No presente estudo, após a reestimulação com o SLA, nós observamos uma diminuição da expressão de IFN- γ nos linfócitos T CD4+ e CD8+ e de granzima B nos linfócitos T CD8+. Por outro lado, a expressão do PD-L1 aumentou na presença do SLA.

A exaustão de linfócitos T CD8+ já foi sugerida em pacientes com Leishmaniose difusa causada por *Leishmania(L.) mexicana*(390). A diminuição da produção de IFN- γ e da proliferação em resposta ao antígeno de *Leishmania (L.) infantum* também já foi mostrada em linfócitos T CD8+ e CD4+ de cães diagnosticados com Leishmaniose causada por *L. (L.) infantum*. Essa exaustão foi revertida com o uso de anticorpos anti-PD-1, levando a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em fagócitos co-cultivados com estes linfócitos(442).

Em outro estudo com camundongos que não expressavam a molécula PD-L1(PD-L1-Knockout) que foram infectados com a *Leishmania (L.) mexicana*, estes mostraram menor carga parasitária e desenvolveram lesões cutâneas de tamanho menor, quando comparados com camundongos selvagens. Além disso, apesar de os camundongos terem produzido quantidades semelhantes de IFN- γ , o grupo PD-L1-Knockout demonstrou produção menor de IL-4 quando comparado com os selvagens(444). Células dendríticas de camundongos PD-L1-Knockout estimuladas com Ovalbunina também mostraram um aumento na secreção de citocinas(445).

O aumento da expressão de PD-L1 também foi observada através do reconhecimento da polyl:C TLR3 em uma interação CD40/CD40L de uma maneira

dependente de NFκB(446). Apesar do TLR3 ser um receptor que reconhece RNA de dupla hélice(dsRNA), muitos estudos identificaram a presença de um RNA vírus em várias espécies de Leishmania, como *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) aetiopica*, *L.(L.) major* e *L.(L.) infantum*(446-449). Somado-se a isso, a presença do LVR1 na Leishmania tem sido associada a falha terapêutica. Em recente estudo com 76 pacientes, sujeitos infectados com *L. (V.) guyanensis* que carregavam o LVR, não responderam ao tratamento, enquanto sujeitos com Leishmania mas sem o vírus responderam(449). Falha terapêutica também foi observada durante infecção por *L.(V.) braziliensis* associada ao LVR1(448). Um estudo realizado em Rondônia mostrou uma associação entre Leishmaniose mucosa e a presença do RNA vírus de Leishmania(450). A maioria dos estudos prospectivos que identificaram a presença do LRV são da região amazônica(451). O paciente deste estudo esteve no estado do Amazonas antes do início das lesões cutâneas e experimentos *in vitro* mostraram um aumento da expressão de PD-L1 associado à exaustão de linfócitos T CD8+ e CD4+ após estimulação com o SLA. Uma hipótese que foi formulada para explicar estas alterações é de que a presença do LVR na *Leishmania (L.) amazonensis* que reconhecida pelo TLR3 levaria ao aumento da expressão de PD-L1 com a exaustão de células T, o que foi evidenciado pela diminuição na expressão de IFN-γ e Granzima B.

Sugerimos que o aumento na expressão de PD-L1 observada em nosso trabalho pode ser um mecanismo que os parasitas exploram para evadir a resposta imunitária. Nossos achados levantam a hipótese que a expressão de PD-L1 em monócitos pode ter papel importante na disfunção de linfócitos T CD8+ e T CD4+ observada na LCD. Surpreendentemente, essa disfunção foi observada meses após o início do tratamento da Leishmaniose e se manteve mesmo com o aumento de moléculas co-estimulatórias que ocorreu após estimulação com o antígeno solúvel de Leishmania e resultou em diminuição da expressão de IFN-γ em linfócitos CD8+ e CD4+, e de Granzima B em linfócitos CD8+. Em seu conjunto os dados nos permitem assumir que, como uma consequência da exposição antigênica crônica, este paciente apresentou-se com exaustão de linfócitos T que persistiu apesar da cura clínica. Esta evolução está de acordo com o conceito presente na literatura de que a exaustão desenvolve-se em um período de 2 a 5 semanas e afeta tanto as

funções T auxiliares como as citotóxicas, e de que, células exaustas não recuperam sua função, mesmo com a retirada do estímulo antigênico(296, 443).

A Leishmaniose difusa uma infecção crônica e de difícil manejo clínico(94). O bloqueio do receptor PD-1 utilizando anticorpos monoclonais está atualmente em investigação para o tratamento de outras doenças infecciosas crônicas e tem mostrado resultados promissores(452). Desta forma, estudar a atividade deste receptor na LCD é um caminho lógico a se seguir para o desenvolvimento de melhores estratégias terapêuticas. Um diagnóstico e tratamento precoces são cruciais para atingir um desfecho clínico satisfatório. Como mostramos em nossos resultados, apesar do tratamento e da ausência de lesões ao tempo da avaliação imunológica, o estado de exaustão antígeno específico após estimulação com o SLA pode persistir e este estado foi provavelmente causado pela via inibitória PD-1/PD-L1.

5.4 LIMITAÇÕES

Entretanto, o estudo apresenta diversas limitações. Com reação a revisão bibliográfica uma limitação importante se refere a avaliação de qualidade dos estudos, sendo que não existe critério avaliativo validado para estudos *in vitro*. Outra limitação se refere a quantidade de bases utilizadas na procura, sendo utilizada apenas a base Pubmed. Da mesma forma, a análise dos estudos foi feita por apenas um avaliador, sendo que é preconizado a avaliação por no mínimo dois ou três revisores, segundo diferentes fontes bibliográficas(453, 454). Devido à dificuldade de obter artigos, muitos deles antigos, também é possível que algum dos artigos não avaliados possa ter sido incluído na revisão caso disponível.

Por último, e talvez a mais importante limitação da revisão seja a heterogeneidade dos estudos. Devido as mudanças dos conceitos e técnicas de estudo da imunologia ao longo dos anos e também da amplitude do próprio tema, é difícil obter dados que possam ser sintetizados de forma objetiva. Optou-se por uma revisão mais ampla, entendendo que apesar de diferentes, os variados marcadores e vias imunológicas se conectam e passam a ter sentido quando avaliados como um todo, e não apenas uma determinada via ou marcador específico. Isso se fez possível devido a raridade da LCD, sendo que uma busca com o nome da doença foi capaz de recuperar apenas 501 trabalhos.

Com relação ao estudo *in vitro* a principal limitação se refere ao fato de ter-se incluído apenas um paciente com a doença. Isso se deve em parte a raridade da doença, que dificulta que um só centro tenha em um pequeno período de tempo e muitos pacientes para realizar o estudo. Desta forma é temeroso extrapolar as conclusões retiradas no caso para todos os pacientes com esta forma de doença.

Outra limitação se refere a relação causal entre a atividade da via PD-1/PD-L1 e a diminuição das funções efetoras. Como já exposto na discussão, em diversos outros contextos esta relação já foi demonstrada, mas não podemos descartar que no caso específico da LCD exista um terceiro fator que explique a alta expressão de PD-L1 na superfície de monócitos derivados de PBMC e a diminuição das funções efetoras, sem que as alterações tivessem relação de causa e efeito. Em nosso estudo, fomos capazes de parcialmente superar esta limitação analisando múltiplas moléculas de superfície de linfócitos e monócitos que já estiveram relacionadas a fisiopatologia da LTA de acordo com estudos anteriores, sendo que nenhuma das alterações encontradas parece explicar a disfunção celular em tela.

Como já discutido, a relação entre a via PD-1/PDL-1, exaustão celular e o desfecho clínico já se mostrou importante em diversas condições patológicas, como neoplasias. Entanto, é possível que, mesmo que alterada, esta via não seja clinicamente importante na LCD e que outros fatores sejam mais determinantes na fisiopatologia da doença.

5.5 PERSPECTIVAS

Para confirmar, que estes achados não são limitados a apenas um sujeito com a doença uma das estratégias a ser adotada em futuros estudos incluem realizar estudos multicêntricos ou transportar pacientes de múltiplas localidades de forma a realizar os experimentos realizados neste estudo em vários sujeitos e comparar estes achados com sujeitos com outras formas da doença. O recrutamento de pacientes para realização deste estudo já está sendo realizado, sendo que os processos para o diagnóstico de mais um caso de LCD já foram completados.

Para confirmar a associação causal entre as alterações na via co-inibitória estudada e as alterações nas funções efetoras poderíamos adicionar uma quarta condição em que, além de estimular as PBMC com o SLA, fizéssemos o bloqueio da via PD-1/PD-L1. Poderíamos então comparar a cultura de células em que o bloqueio

foi realizado e a cultura em que este não foi realizado. Este estudo está em andamento, sendo que a compra dos insumos para sua realização já foi realizada.

Para a confirmação da hipótese de que as alterações imunes da LCD estariam ligadas a presença de LRV1 de *Leishmania* poderia ser feito em conjunto com o estudo imunológico a pesquisa do vírus nas *Leishmania* dos sujeitos do estudo. Isso poderia ser correlacionado com os achados do estudo *in vitro* e com os parâmetros clínico laboratoriais dos pacientes. A Universidade de Brasília tem a capacidade técnica para a realização deste estudo, sendo necessário apenas a compra de materiais de consumo específico.

Uma maneira de avaliar se as alterações encontradas têm realmente relevância clínica seria utilizar um bloqueador da via para tratamento de pacientes com LCD, como já explicado anteriormente. Apesar de a doença ser rara, esta estratégia é factível, já que como trata-se de uma doença de difícil tratamento, é possível que existam pacientes com longo tempo de doença sem resposta terapêutica que possam ser incluídos no estudo. O recrutamento de pacientes de várias regiões do país através de contato com centros de referência no tratamento de LTA é uma estratégia a ser adotada. O contato com os centros de referência já está sendo realizado e já foi possível entrar em contato com um paciente com 30 anos de doença que é possível candidato a entrar no estudo.

6 CONCLUSÃO

1. Quando comparado aos controles, a expressão de PD-L1 em monócitos derivados de PBMC após 48hs de estímulo com o antígeno de Leishmania esteve elevada, estando esta associada a menor expressão de IFN- γ e Granzyma B na superfície de linfócitos. Estas alterações nas moléculas em Linfócitos, não parecem ser explicadas por alterações significativas de CD44, HLA-DR, CD86, CD80 e CD40 na superfície de monócitos.
2. Na análise *ex vivo* Monócitos (CD14+) do sujeito apresentavam alta expressão de CD40, CD44, HLA-DR e CD86, mas baixa expressão de CD80 e PD-L1. Estavam presentes em maior número de LT CD3+CD8+ que de LT CD3+CD8+, e maiores números de LT CD8+CD45RO que de LT regulatórios CD4+CD25+ ou LT CD8+CD45RA.
3. Após estímulo com o SLA a expressão *in vitro* de CD44, HLA-DR, CD86, CD80 e CD40 em monócitos foram semelhantes entre as células estimuladas com o SLA e os controles negativos.
4. A revisão da literatura mostrou que existe uma mudança no paradigma na imunopatogênese da LCD que leva em conta além do paradigma clássico Th1/Th2 outros fatores, entre eles a presença de mediadores inibitórios, o que foi corroborado pelos achados deste estudo.

7. APENDICE

Quadro Apêndice- Trabalhos não incluídos no estudo e motivo de não inclusão

Trabalho	
(2016). "Correction: Down-Regulation of TLR and JAK/STAT Pathway Genes Is Associated with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis: A Gene Expression Analysis in NK Cells from Patients Infected with <i>Leishmania Mexicana</i> ." <i>PLoS Negl Trop Dis</i> 10(4): e0004666.	1
Abdel-Hameed, A. A., et al. (1990). "A case of diffuse cutaneous leishmaniasis due to <i>Leishmania major</i> ." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 84(4): 535-536.	4
Abreu-Silva, A. L., et al. (2004). "Histopathological studies of visceralized <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> in mice experimentally infected." <i>Vet Parasitol</i> 121(3-4): 179-187.	2
Akilov, O. E., et al. (2007). "T helper type 1 cytokines and keratinocyte growth factor play a critical role in pseudoepitheliomatous hyperplasia initiation during cutaneous leishmaniasis." <i>Arch Dermatol Res</i> 299(7): 315-325.	2
Albanese, F., et al. (2006). "Extragenital transmissible venereal tumour associated with circulating neoplastic cells in an immunologically compromised dog." <i>Vet Comp Oncol</i> 4(1): 57-62.	2
Alcais, A., et al. (1997). "Evidence for a major gene controlling susceptibility to tegumentary leishmaniasis in a recently exposed Bolivian population." <i>Am J Hum Genet</i> 61(4): 968-979.	4
Alcolea, P. J., et al. (2016). "Proteome profiling of the growth phases of <i>Leishmania pifanoi</i> promastigotes in axenic culture reveals differential abundance of immunostimulatory proteins." <i>Acta Trop</i> 158: 240-247.	3
Alcover, M. M., et al. (2018). "Case Report: Diffuse Cutaneous Leishmaniasis by <i>Leishmania infantum</i> in a Patient Undergoing Immunosuppressive Therapy: Risk Status in an Endemic Mediterranean Area." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 98(5): 1313-1316.	4
Almeida-Amaral, E. E., et al. (2007). " <i>Leishmania amazonensis</i> : PKC-like protein kinase modulates the (Na ⁺⁺ K ⁺)ATPase activity." <i>Exp Parasitol</i> 116(4): 419-426.	2
Al-Sohaibani, M. O. (1996). "Bone marrow histopathological changes in visceral leishmaniasis." <i>Ann Saudi Med</i> 16(3): 304-307.	3
Alvar, J., et al. (1997). " <i>Leishmania</i> and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years." <i>Clin Microbiol Rev</i> 10(2): 298-319.	1
Alves, G. B., et al. (2010). "Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> ." <i>Braz J Med Biol Res</i> 43(3): 310-315.	3
Anderson, S. A. and A. J. Mukkada (1994). "Biochemical and immunochemical characterization of a P-type ATPase from <i>Leishmania donovani</i> promastigote plasma membrane." <i>Biochim Biophys Acta</i> 1195(1): 71-80.	2
Angarano, G., et al. (1998). "Diffuse necrotic hepatic lesions due to visceral leishmaniasis in AIDS." <i>J Infect</i> 36(2): 167-169.	3
Aresu, L., et al. (2007). "Membranoproliferative glomerulonephritis type III in a simultaneous infection of <i>Leishmania infantum</i> and <i>Dirofilaria immitis</i> in a dog." <i>J Vet Diagn Invest</i> 19(5): 569-572.	2
Azadeh, B., et al. (1985). "Histological spectrum of cutaneous leishmaniasis due to <i>Leishmania tropica</i> ." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 79(5): 631-636.	4
Baba, C. S., et al. (2006). "Chronic diarrhea and malabsorption caused by <i>Leishmania donovani</i> ." <i>Indian J Gastroenterol</i> 25(6): 309-310.	3
Bacon, K. M., et al. (2013). "The potential economic value of a cutaneous leishmaniasis vaccine in seven endemic countries in the Americas." <i>Vaccine</i> 31(3): 480-486.	4
Badaro, R. and W. D. Johnson, Jr. (1993). "The role of interferon-gamma in the treatment of visceral and diffuse cutaneous leishmaniasis." <i>J Infect Dis</i> 167 Suppl 1: S13-17.	4
Baghestani, S., et al. (1998). "Post-kala-azar dermal leishmaniasis." <i>Eur J Dermatol</i> 8(4): 277-279.	3
Bailey, S., et al. (1994). "Structure of trypanothione reductase from <i>Crithidia fasciculata</i> at 2.6 Å resolution; enzyme-NADP interactions at 2.8 Å resolution." <i>Acta Crystallogr D Biol Crystallogr</i> 50(Pt 2): 139-154.	2
Bains, A., et al. (2016). "Unusual presentation of mucocutaneous leishmaniasis in HIV-infected patient." <i>Indian J Sex Transm Dis AIDS</i> 37(2): 193-196.	3
Banihashemi, M., et al. (2016). "Serum Vitamin D3 Level in Patients with Female Pattern Hair	3

Continua

Loss." Int J Trichology 8(3): 116-120.	
Banuls, J., et al. (1995). "Leishmaniasis as a cause of oral disease in HIV infection." Aids 9(1): 96-98.	4
Barbosa-De-Deus, R., et al. (2002). "Leishmania major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis." Clin Diagn Lab Immunol 9(6): 1361-1366.	4
Barbosa-Santos, E. G., et al. (1994). "Leishmaniasis disseminated by Leishmania braziliensis in a mare (Equus caballus) immunotherapy and chemotherapy assays." Mem Inst Oswaldo Cruz 89(2): 217-220.	2
Barbosa-Santos, E. G., et al. (1994). "Leishmaniasis disseminated by Leishmania braziliensis in a mare (Equus caballus) immunotherapy and chemotherapy assays." Mem Inst Oswaldo Cruz 89(2): 217-220.	2
Bardagi, M., et al. (2010). "Histopathological differences between canine idiopathic sebaceous adenitis and canine leishmaniosis with sebaceous adenitis." Vet Dermatol 21(2): 159-165.	2
Barnes, J. C., et al. (1993). "Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat." J Am Vet Med Assoc 202(3): 416-418.	2
Barral, A., et al. (1983). "Late metastatic Leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease." Am J Trop Med Hyg 32(2): 277-285.	2
Barro-Traore, F., et al. (2008). "[Cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major involving the bone marrow in an AIDS patient in Burkina Faso]." Ann Dermatol Venereol 135(5): 380-383.	4
Bates, E. J., et al. (2000). "Poly(A)-binding protein I of Leishmania: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites." Nucleic Acids Res 28(5): 1211-1220.	2
Becker, I., et al. (1999). "The efficacy of pentamidine combined with allopurinol and immunotherapy for the treatment of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis." Parasitol Res 85(3): 165-170.	4
Bekele, S., et al. (2014). "Recent trends of cutaneous leishmaniasis in Alert Hospital, Addis Ababa." Ethiop Med J Suppl 1: 37-41.	4
Berman, J. D. and J. V. Gallalee (1985). "Antileishmanial activity of human red blood cells containing formycin A." J Infect Dis 151(4): 698-703.	3
Berman, J. D., et al. (1982). "Susceptibility of clinically sensitive and resistant Leishmania to pentavalent antimony in vitro." Am J Trop Med Hyg 31(3 Pt 1): 459-465.	2
Berman, J. J. (2008). "Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 status." Expert Opin Drug Metab Toxicol 4(9): 1209-1216.	1
Berzunza-Cruz, M., et al. (2000). "Leishmania mexicana mexicana: genetic heterogeneity of mexican isolates revealed by restriction length polymorphism analysis of kinetoplast DNA." Exp Parasitol 95(4): 277-284.	4
Bezerra-Souza, A., et al. (2016). "The antifungal compound butenafine eliminates promastigote and amastigote forms of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) braziliensis." Parasitol Int 65(6 Pt A): 702-707.	3
Bhattacharya, A., et al. (1992). "Identification and partial characterization of a lipophosphoglycan from a pathogenic strain of Entamoeba histolytica." Mol Biochem Parasitol 56(1): 161-168.	3
Bittencourt, A. L. and L. A. Rodrigues de Freitas (1983). "[Diffuse cutaneous leishmaniasis. Anatomic-pathologic aspects]." Med Cutan Ibero Lat Am 11(4): 265-270.	5
Bittencourt, A. L., et al. (1990). "Distinct ultrastructural aspects in different biopsies of a single patient with diffuse cutaneous leishmaniasis." Mem Inst Oswaldo Cruz 85(1): 53-59.	4
Bittencourt, A. L., et al. (1992). "Diffuse cutaneous leishmaniasis with atypical aspects." Int J Dermatol 31(8): 568-570.	4
Bittencourt, A., et al. (1989). "In situ identification of Leishmania amazonensis associated with diffuse cutaneous leishmaniasis in Bahia, Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz 84(4): 585-586.	4
Blum-Dominguez, S. D., et al. (2017). "[Diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) and visceral leishmaniasis (VL) concurrent with cancer: Presentation of a case]." Gac Med Mex 153(1): 121-124.	4
Boecken, G., et al. (2011). "[Diagnosis and therapy of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis in Germany]." J Dtsch Dermatol Ges 9 Suppl 8: 1-51.	1
Bonfante-Garrido, R., et al. (1981). "[Phlebotominae in an area of diffuse cutaneous leishmaniasis in Venezuela]." Bol Oficina Sanit Panam 90(5): 410-414.	4
Bonfante-Garrido, R., et al. (1996). "Disseminated American cutaneous leishmaniasis." Int J Dermatol 35(8): 561-565.	4

Borges, V. M., et al. (1998). "Subverted transferrin trafficking in Leishmania-infected macrophages." <i>Parasitol Res</i> 84(10): 811-822.	2
Bray, R. S. and R. W. Ashford (1971). "Pyrexia treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 65(1): 103.	4
Bretana, A., et al. (1983). "Leishmania species: comparative ultrastructure of experimental nodules and diffuse human cutaneous lesions in American leishmaniasis." <i>Exp Parasitol</i> 55(3): 377-385.	4
Bryceson, A. D. (1970). "Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. II. Treatment." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 64(3): 369-379.	4
Butsch, F., et al. (2013). "Two cases of successful treatment of multilesional cutaneous leishmaniasis with liposomal amphotericin B." <i>J Dtsch Dermatol Ges</i> 11(1): 83-85.	3
Caceres-Dittmar, G., et al. (1992). "Epidermal compromise in American cutaneous leishmaniasis." <i>J Invest Dermatol</i> 99(5): 95s-98s.	1
Calvopina, M., et al. (2006). "Relapse of new world diffuse cutaneous leishmaniasis caused by <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> after miltefosine treatment." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 75(6): 1074-1077.	4
Calvopina, M., et al. (2017). "Coinfection of <i>Leishmania guyanensis</i> and Human Immunodeficiency Virus-Acquired Immune Deficiency Syndrome: Report of a Case of Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in Ecuador." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 96(5): 1151-1154.	3
Calza, L., et al. (2004). "Disseminated cutaneous leishmaniasis after visceral disease in a patient with AIDS." <i>J Am Acad Dermatol</i> 50(3): 461-465.	3
Cantanhede, L. M., et al. (2015). "Further Evidence of an Association between the Presence of <i>Leishmania</i> RNA Virus 1 and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients." <i>PLoS Negl Trop Dis</i> 9(9): e0004079.	4
Carlsen, E. D., et al. (2015). "Interactions between Neutrophils and <i>Leishmania braziliensis</i> Amastigotes Facilitate Cell Activation and Parasite Clearance." <i>J Innate Immun</i> 7(4): 354-363.	2
Carvalho, B. M., et al. (2013). "Leishmaniasis transmission in an ecotourism area: potential vectors in Ilha Grande, Rio de Janeiro State, Brazil." <i>Parasit Vectors</i> 6(1): 325.	4
Carvalho, E. M., et al. (1994). "Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis." <i>Acta Trop</i> 56(4): 315-325.	3
Castellano, L. R., et al. (2009). "Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production." <i>Hum Immunol</i> 70(6): 383-390.	3
Castes, M. and F. J. Tapia (1998). "[Immunopathology of American tegumentary leishmaniasis]." <i>Acta Cient Venez</i> 49(1): 42-56.	1
Cavelier, B., et al. (1984). "[Post-kala-azar dermal leishmaniasis or diffuse cutaneous leishmaniasis]." <i>Ann Dermatol Venereol</i> 111(6-7): 579-586.	5
Cesinaro, A. M., et al. (2017). "An outbreak of cutaneous leishmaniasis in Modena province (Northern Italy): report of 35 cases." <i>Pathologica</i> 109(4): 363-367.	3
Chaudhary, R. G., et al. (2008). "Diffuse cutaneous leishmaniasis: co-infection with human immunodeficiency virus (HIV)." <i>Indian J Dermatol Venereol Leprol</i> 74(6): 641-643.	4
Choi, C. M. and E. A. Lerner (2002). "Leishmaniasis: recognition and management with a focus on the immunocompromised patient." <i>Am J Clin Dermatol</i> 3(2): 91-105.	1
Ciaramella, P., et al. (1997). "A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by <i>Leishmania infantum</i> ." <i>Vet Rec</i> 141(21): 539-543.	2
Cnudde, F., et al. (1994). "Diffuse cutaneous leishmaniasis with visceral dissemination in an AIDS patient in Guadeloupe, West Indies." <i>Aids</i> 8(4): 559-560.	4
Coelho, A. C., et al. (2014). "In vitro and in vivo miltefosine susceptibility of a <i>Leishmania amazonensis</i> isolate from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis." <i>PLoS Negl Trop Dis</i> 8(7): e2999.	3
Coelho, A. C., et al. (2016). "In Vitro and In Vivo Miltefosine Susceptibility of a <i>Leishmania amazonensis</i> Isolate from a Patient with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis: Follow-Up." <i>PLoS Negl Trop Dis</i> 10(7): e0004720.	1
Cohen, H. A. (1979). "Induction of delayed-type sensitivity to <i>Leishmania</i> parasite in a case of leishmaniasis cutanea diffusa with BCG and cord-factor (Trehalose-6-6' dimycolate)." <i>Acta Derm Venereol</i> 59(6): 547-549.	4
Coimbra, E. S., et al. (2008). "A <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> ATP diphosphohydrolase isoform and potato apyrase share epitopes: antigenicity and correlation with disease progression." <i>Parasitology</i> 135(3): 327-335.	4

Continuação

Coler, R. N. and S. G. Reed (2005). "Second-generation vaccines against leishmaniasis." <i>Trends Parasitol</i> 21(5): 244-249.	1
Colmenares, M., et al. (2002). "Mechanisms of pathogenesis: differences amongst <i>Leishmania</i> species." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 96 Suppl 1: S3-7.	1
Colombo, S., et al. (2016). "Pustular dermatitis in dogs affected by leishmaniosis: 22 cases." <i>Vet Dermatol</i> 27(1): 9-e4.	2
Convit, J. (1996). "Leishmaniasis: Immunological and clinical aspects and vaccines in Venezuela." <i>Clin Dermatol</i> 14(5): 479-487.	1
Convit, J. and M. Ulrich (1993). "Antigen-specific immunodeficiency and its relation to the spectrum of American cutaneous leishmaniasis." <i>Biol Res</i> 26(1-2): 159-166.	5
Convit, J., et al. (1972). "Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 66(4): 603-610.	4
Convit, J., et al. (1989). "Immunotherapy of localized, intermediate, and diffuse forms of American cutaneous leishmaniasis." <i>J Infect Dis</i> 160(1): 104-115.	4
Convit, J., et al. (1993). "The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 87(4): 444-448.	1
Corbett, C. E., et al. (1993). "Regression of diffuse intralobular liver fibrosis associated with visceral leishmaniasis." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 49(5): 616-624.	3
Cordova-Uscanga, C., et al. (1993). "[Leishmaniasis: a preliminary epidemiological study in a locality of the endemic area in the state of the Tabasco]." <i>Salud Publica Mex</i> 35(4): 345-350.	4
Cornegliani, L., et al. (2015). "Identification by real-time PCR with SYBR Green of <i>Leishmania</i> spp. and <i>Serratia marcescens</i> in canine 'sterile' cutaneous nodular lesions." <i>Vet Dermatol</i> 26(3): 186-192, e138.	2
Costa, A. A., et al. (2005). "Imaging exams of bone lesions in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL)." <i>Acta Trop</i> 96(1): 9-15.	4
Costa, A. A., et al. (2006). "Experimental model of chronic osteomyelitis caused by <i>Leishmania</i> (L) amazonensis." <i>Acta Trop</i> 98(2): 125-129.	2
Costa, A., et al. (2018). "Visceral Leishmaniasis Associated with Macrophage Activation Syndrome and Diffuse Alveolar Hemorrhage in a Lupus Patient." <i>Acta Med Port</i> 31(10): 593-596.	3
Costa, F. A., et al. (2000). "CD4(+) T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis." <i>Braz J Med Biol Res</i> 33(12): 1455-1458.	2
Costa, J. M. (1995). "[Nipple involvement in diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) produced by <i>Leishmania</i> (L) amazonensis]." <i>Rev Soc Bras Med Trop</i> 28(2): 139.	4
Costa, J. M., et al. (1991). "[Current status of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the State of Maranhao. I. Preliminary report]." <i>Rev Soc Bras Med Trop</i> 24(1): 59-60.	4
Costa, J. M., et al. (1992). "[The current status of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the state of Maranhao. II. The epidemiological and clinico-evolutionary aspects]." <i>Rev Soc Bras Med Trop</i> 25(2): 115-123.	4
Costa, J. M., et al. (1995). "Diabetes mellitus associated with pentamidine isethionate in diffuse cutaneous leishmaniasis." <i>Rev Soc Bras Med Trop</i> 28(4): 405-407.	4
Costa, J. M., et al. (1995). "Spontaneous regional healing of extensive skin lesions in diffuse cutaneous Leishmaniasis (DCL)." <i>Rev Soc Bras Med Trop</i> 28(1): 45-47.	4
Couppie, P., et al. (2004). "Disseminated cutaneous leishmaniasis due to <i>Leishmania guyanensis</i> : case of a patient with 425 lesions." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 71(5): 558-560.	3
Cunha, B. A. (2004). "Fever of unknown origin caused by adult juvenile rheumatoid arthritis: the diagnostic significance of double quotidian fevers and elevated serum ferritin levels." <i>Heart Lung</i> 33(6): 417-421.	3
Cunha, B. A. and A. Petelin (2013). "Fever of unknown origin (FUO) due to large B-cell lymphoma: the diagnostic significance of highly elevated alkaline phosphatase and serum ferritin levels." <i>Heart Lung</i> 42(1): 67-71.	3
Cupolilo, S. M., et al. (2003). "Biological behavior of <i>Leishmania</i> (L.) amazonensis isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice." <i>Histol Histopathol</i> 18(4): 1059-1065.	2
Cuvillier, A., et al. (2000). "LdARL-3A, a <i>Leishmania</i> promastigote-specific ADP-ribosylation factor-like protein, is essential for flagellum integrity." <i>J Cell Sci</i> 113 (Pt 11): 2065-2074.	3
Da Fonseca Ade, P., et al. (1981). "[Diffuse cutaneous leishmaniasis]." <i>Med Cutan Ibero Lat Am</i> 9(5): 317-322.	5
da Silva, A. R., et al. (1981). "[Diffuse cutaneous leishmaniasis. Report of a case in Buriticupu	4

Continua

(State of Maranhao, Brazil)]." <i>Rev Inst Med Trop Sao Paulo</i> 23(1): 31-35.	
da Silva, G. A., et al. (2014). "Mucocutaneous Leishmaniasis/HIV Coinfection Presented as a Diffuse Desquamative Rash." <i>Case Rep Infect Dis</i> 2014: 293761.	3
Danescu, S. A., et al. (2018). "Unusual Manifestations of Secondary Syphilis: Case Presentations." <i>Acta Dermatovenerol Croat</i> 26(2): 186-188.	3
Dantas, M. L., et al. (2014). "Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis." <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 109(2): 202-209.	3
Dassoni, F., et al. (2013). "Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis resembling borderline-tuberculoid leprosy: a new clinical presentation?" <i>Acta Derm Venereol</i> 93(1): 74-77.	4
Davies, C. R., et al. (2000). "The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries." <i>Cad Saude Publica</i> 16(4): 925-950.	4
de Almeida-Amaral, E. E., et al. (2006). "Leishmania amazonensis: characterization of an ecto-phosphatase activity." <i>Exp Parasitol</i> 114(4): 334-340.	2
de Almeida-Amaral, E. E., et al. (2008). "Leishmania amazonensis: characterization of an ouabain-insensitive Na ⁺ -ATPase activity." <i>Exp Parasitol</i> 118(2): 165-171.	2
de Freitas Rocha, A. T., et al. (2018). "Visceral leishmaniasis and vulnerability conditions in an endemic urban area of Northeastern Brazil." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> .	3
De Lucia, M., et al. (2017). "A retrospective study comparing histopathological and immunopathological features of nasal planum dermatitis in 20 dogs with discoid lupus erythematosus or leishmaniosis." <i>Vet Dermatol</i> 28(2): 200-e246.	3
de Macedo-Silva, S. T., et al. (2015). "Potent In Vitro Antiproliferative Synergism of Combinations of Ergosterol Biosynthesis Inhibitors against Leishmania amazonensis." <i>Antimicrob Agents Chemother</i> 59(10): 6402-6418.	3
Dedet, J. P. and F. Pratlong (2000). "Leishmania, Trypanosoma and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents." <i>J Eukaryot Microbiol</i> 47(1): 37-39.	1
Dedet, J. P., et al. (1995). "Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous trypanosomatid in a patient infected with HIV." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 89(6): 644-646.	3
Delgado-Dominguez, J., et al. (2010). "Leishmania mexicana lipophosphoglycan differentially regulates PKC α -induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice." <i>Parasite Immunol</i> 32(6): 440-449.	2
Delorenzi, J. C., et al. (2002). "In vitro activities of iboga alkaloid congeners coronaridine and 18-methoxycoronaridine against Leishmania amazonensis." <i>Antimicrob Agents Chemother</i> 46(7): 2111-2115.	4
Demirci, G. T., et al. (2012). "Parotid tuberculosis associated with cutaneous tuberculosis on a medial epicanthus." <i>Skinmed</i> 10(5): 319-321.	4
Derrien, J. P., et al. (1978). "[Evolution towards generalization and cancer of a muco-cutaneous leishmaniasis treated with corticoids. (Report of a Chadian case) (author's transl)]." <i>Med Trop (Mars)</i> 38(4): 447-451.	3
Desjeux, P. (1992). "Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects." <i>World Health Stat Q</i> 45(2-3): 267-275.	1
Develoux, M., et al. (1996). "Diffuse cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major in Senegal." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 90(4): 396-397.	4
Diaz-Gandarilla, J. A., et al. (2013). "PPAR activation induces M1 macrophage polarization via cPLA(2)-COX-2 inhibition, activating ROS production against Leishmania mexicana." <i>Biomed Res Int</i> 2013: 215283.	2
Diehl, E. S., et al. (2008). "Localized cutaneous leishmaniasis of the plantar region: a 40-year outcome." <i>Dermatol Online J</i> 14(12): 15.	3
Dimier-David, L., et al. (1994). "[Histopathology of mucocutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Vianna) braziliensis]." <i>Ann Dermatol Venereol</i> 121(5): 387-392.	3
Donnelly, K. B., et al. (1998). "Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with Leishmania braziliensis in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate." <i>J Parasitol</i> 84(1): 97-103.	2
Dorta, M. L., et al. (2012). "Improvements in obtaining New World Leishmania sp from mucosal lesions: notes on isolating and stocking parasites." <i>Exp Parasitol</i> 132(2): 300-303.	4
dos Reis, V. L., et al. (1980). "[Transfer factor in diffuse cutaneous leishmaniasis. Experience with one case]." <i>Med Cutan Ibero Lat Am</i> 8(4-6): 95-100.	4
dos-Santos, W. L., et al. (2004). "Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniosis." <i>Parasitol Res</i> 92(2): 89-94.	3

Dowlati, Y. (1996). "Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect." <i>Clin Dermatol</i> 14(5): 425-431.	1
Duarte, M. I., et al. (1983). "Interstitial nephritis in human kala-azar." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 77(4): 531-537.	3
Duhagon, M. A., et al. (2009). "The Trypanosoma cruzi nucleic acid binding protein Tc38 presents changes in the intramitochondrial distribution during the cell cycle." <i>BMC Microbiol</i> 9: 34.	3
Durand, I., et al. (1998). "[Disseminated cutaneous leishmaniasis revealing human immunodeficiency virus infection]." <i>Ann Dermatol Venereol</i> 125(4): 268-270.	3
Ei-On, J., et al. (1988). "Topical chemotherapy of cutaneous Leishmaniasis." <i>Parasitol Today</i> 4(3): 76-81.	4
el Hassan, A. M., et al. (1996). "The pathology of cutaneous leishmaniasis in the Sudan: a comparison with that in other geographical areas." <i>Ann Trop Med Parasitol</i> 90(5): 485-490.	4
el-Safi, S. H., et al. (1991). "Studies on the leishmaniasis in the Sudan. 2. Clinical and parasitological studies on cutaneous leishmaniasis." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 85(4): 457-464.	4
Erdem, A., et al. (2013). "[Co-occurrence of visceral leishmaniasis and lymphoma]." <i>Turkiye Parazitoloj Derg</i> 37(4): 282-284.	3
Felizardo, T. C., et al. (2007). "Leishmania (Leishmania) amazonensis infection and dissemination in mice inoculated with stationary-phase or with purified metacyclic promastigotes." <i>Parasitology</i> 134(Pt 12): 1699-1707.	2
Fernandez-Miranda, C., et al. (1993). "Diffuse nodular regenerative hyperplasia of the liver associated with human immunodeficiency virus and visceral leishmaniasis." <i>Am J Gastroenterol</i> 88(3): 433-435.	3
Ferreira, L. T., et al. (2015). "GENOTYPE CHARACTERIZATION OF Leishmania (Viannia) braziliensis ISOLATED FROM HUMAN AND CANINE BIOPSIES WITH AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS." <i>Rev Inst Med Trop Sao Paulo</i> 57(3): 257-262.	3
Figliuolo, V. R., et al. (2017). "The role of the P2X7 receptor in murine cutaneous leishmaniasis: aspects of inflammation and parasite control." <i>Purinergic Signal</i> 13(2): 143-152.	2
Figueiredo, M. M., et al. (2013). "Expression of Toll-like receptors 2 and 9 in cells of dog jejunum and colon naturally infected with Leishmania infantum." <i>BMC Immunol</i> 14: 22.	3
Fikre, H., et al. (2017). "Clinical features and treatment response of cutaneous leishmaniasis in North-West Ethiopia." <i>Trop Med Int Health</i> 22(10): 1293-1301.	4
Fischer, M., et al. (2002). "[Diffuse infiltration of the external ear in a 59-year-old Brazilian patient. "New world" cutaneous leishmaniasis (leishmaniasis tegumentar Americana)]." <i>Hautarzt</i> 53(5): 342-346.	4
Fonteles, R. S., et al. (2016). "Experimental Infection of Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) With Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (L.) amazonensis, Etiological Agents of American Tugumentary Leishmaniasis." <i>J Med Entomol</i> 53(1): 206-209.	3
Franca-Costa, J., et al. (2012). "Exposure of phosphatidylserine on Leishmania amazonensis isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity." <i>PLoS One</i> 7(5): e36595.	3
Franca-Costa, J., et al. (2015). "Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis." <i>J Infect Dis</i> 211(3): 426-435.	2
Franke, E. D., et al. (1990). "Diffuse cutaneous leishmaniasis acquired in Peru." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 43(3): 260-262.	4
Freeman, K. S., et al. (2010). "Leishmaniasis in a dog native to Colorado." <i>J Am Vet Med Assoc</i> 237(11): 1288-1291.	3
Freitas-Mesquita, A. L., et al. (2014). "Leishmania amazonensis: characterization of an ecto-pyrophosphatase activity." <i>Exp Parasitol</i> 137: 8-13.	2
Galioto, P. and V. Fornaro (2002). "A case of mucocutaneous leishmaniasis." <i>Ear Nose Throat J</i> 81(1): 46-48.	3
Gallina, V., et al. (2014). "Imported visceral leishmaniasis - unexpected bone marrow diagnosis in a patient with fever, pancytopenia, and splenomegaly." <i>Am J Blood Res</i> 4(2): 101-105.	3
Galvao, C. E., et al. (1993). "[Disseminated cutaneous leishmaniasis due to Leishmania viannia braziliensis in the state of Maranhao, Brazil]." <i>Rev Soc Bras Med Trop</i> 26(2): 121-123.	3
Garcia, A. R., et al. (2017). "Cytotoxicity and anti-Leishmania amazonensis activity of Citrus sinensis leaf extracts." <i>Pharm Biol</i> 55(1): 1780-1786.	3
Garcia-Alonso, M., et al. (1996). "Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis."	3

Parasite Immunol 18(12): 617-623.	
Gaze, S. T., et al. (2006). "Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population." Scand J Immunol 63(1): 70-78.	3
Genaro, O., et al. (1996). "Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil." Clin Dermatol 14(5): 503-512.	4
Ghoshal, A., et al. (2010). "Sialic acids in different Leishmania sp., its correlation with nitric oxide resistance and host responses." Glycobiology 20(5): 553-566.	2
Giarola, N. L., et al. (2014). "Leishmania amazonensis: Increase in ecto-ATPase activity and parasite burden of vinblastine-resistant protozoa." Exp Parasitol 146: 25-33.	2
Githure, J. I., et al. (1987). "Leishmania major: the suitability of East African nonhuman primates as animal models for cutaneous leishmaniasis." Exp Parasitol 64(3): 438-447.	2
Giudice, A., et al. (2007). "Resistance of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) braziliensis to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis." BMC Infect Dis 7: 7.	3
Godinho, J. L., et al. (2012). "Efficacy of miltefosine treatment in Leishmania amazonensis-infected BALB/c mice." Int J Antimicrob Agents 39(4): 326-331.	2
Godinho, J. L., et al. (2013). "A novel alkyl phosphocholine-dinitroaniline hybrid molecule exhibits biological activity in vitro against Leishmania amazonensis." Exp Parasitol 135(1): 153-165.	4
Gomes, R. S., et al. (2015). "E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of Leishmania amazonensis inhibits macrophage activation." Microbes Infect 17(4): 295-303.	3
Goncalves, R., et al. (2003). "Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi: a histopathological and morphometric study." Rev Inst Med Trop Sao Paulo 45(3): 153-158.	3
Gontijo, B. and L. de Carvalho Mde (2003). "[American cutaneous leishmaniasis]." Rev Soc Bras Med Trop 36(1): 71-80.	1
Gonzalez, J. L., et al. (1990). "Erosive colitis in experimental canine Leishmaniasis." Zentralbl Veterinarmed B 37(5): 377-382.	3
Gonzalez, L. M. and I. D. Velez (2006). "[Miltefosine for disseminated cutaneous leishmaniasis]." Biomedica 26 Suppl 1: 13-16.	3
Goto, H. and J. A. Lauletta Lindoso (2012). "Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis." Infect Dis Clin North Am 26(2): 293-307.	1
Gramiccia, M., et al. (1985). "[The genus Leishmania in Italy]." Parassitologia 27(3): 187-201.	3
Grevelink, S. A. and E. A. Lerner (1996). "Leishmaniasis." J Am Acad Dermatol 34(2 Pt 1): 257-272.	1
Guenoun, F. Z., et al. (1990). "[A diffuse and persistent skin eruption in an immunosuppressed patient]." Ann Pathol 10(5-6): 365-366.	5
Guimaraes, L. H., et al. (2009). "Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of Leishmania braziliensis in the state of Bahia, Brazil." Trans R Soc Trop Med Hyg 103(7): 712-715.	4
Hailu, A. (1990). "Pre- and post-treatment antibody levels in visceral leishmaniasis." Trans R Soc Trop Med Hyg 84(5): 673-675.	4
Hailu, A., et al. (1995). "Leishmania aethiops: experimental infections in non-human primates." Acta Trop 59(3): 243-250.	2
Handler, M. Z., et al. (2015). "Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management." J Am Acad Dermatol 73(6): 911-926; 927-918.	1
Hashemi, S. A., et al. (2018). "First case report of atypical disseminated cutaneous leishmaniasis in an opium abuser in Iran." Rev Inst Med Trop Sao Paulo 60: e5.	3
Hashiguchi, Y. and E. A. Gomez Landires (1991). "A review of leishmaniasis in Ecuador." Bull Pan Am Health Organ 25(1): 64-76.	4
Hashiguchi, Y., et al. (2016). "Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review." Trop Med Health 44: 2.	4
Heath, T. C., et al. (1995). "Disseminated Penicillium marneffeii: presenting illness of advanced HIV infection; a clinicopathological review, illustrated by a case report." Pathology 27(1): 101-105.	3
Hengge, U. R. and A. Marini (2008). "[Cutaneous leishmaniasis]." Hautarzt 59(8): 627-632.	1
Henriksen, T. H. and S. Lende (1983). "Treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis with chlorpromazine ointment." Lancet 1(8316): 126.	4
Henriques, C. and W. de Souza (2000). "Redistribution of plasma-membrane surface molecules during formation of the Leishmania amazonensis-containing parasitophorous vacuole." Parasitol	3

Res 86(3): 215-225.	
Hernandez, M. X., et al. (2006). "Vaccine-induced protection against <i>Leishmania amazonensis</i> is obtained in the absence of IL-12/23p40." <i>Immunol Lett</i> 105(1): 38-47.	2
Hernandez-Montes, O., et al. (2012). "Analysis of Kinetoplast DNA from Mexican Isolates of <i>Leishmania (L.) mexicana</i> ." <i>Interdiscip Perspect Infect Dis</i> 2012: 279081.	2
Herrera, E., et al. (1995). "Disseminated cutaneous leishmaniasis in an HIV-infected patient." <i>Int J STD AIDS</i> 6(2): 125-126.	3
Hodgkinson, V. H., et al. (1996). " <i>Leishmania amazonensis</i> : cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms." <i>Exp Parasitol</i> 83(1): 94-105.	2
Hooja, S., et al. (2014). "First reported cases of diffuse cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus positive patients in Jaipur District of Rajasthan, India." <i>Trop Parasitol</i> 4(1): 50-52.	4
Humber, D. P., et al. (1989). " <i>Leishmania aethiops</i> : infections in laboratory animals." <i>Exp Parasitol</i> 68(2): 155-159.	2
Ilg, T., et al. (1991). "Secreted acid phosphatase of <i>Leishmania mexicana</i> : a filamentous phosphoglycoprotein polymer." <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 88(19): 8774-8778.	3
Isaac-Marquez, A. P., et al. (2018). "Decanethiol functionalized silver nanoparticles are new powerful leishmanicidals in vitro." <i>World J Microbiol Biotechnol</i> 34(3): 38.	3
Jabbour, M. N., et al. (2015). "The immune microenvironment in cutaneous leishmaniasis." <i>J Eur Acad Dermatol Venereol</i> 29(6): 1170-1179.	3
Jaffe, C. L. and M. Zalis (1988). "Purification of two <i>Leishmania donovani</i> membrane proteins recognized by sera from patients with visceral leishmaniasis." <i>Mol Biochem Parasitol</i> 27(1): 53-62.	3
Jaffe, C. L., et al. (1990). " <i>Leishmania tropica</i> : characterization of a lipophosphoglycan-like antigen recognized by species-specific monoclonal antibodies." <i>Exp Parasitol</i> 70(1): 12-24.	3
Ji, J., et al. (2003). "Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with <i>Leishmania amazonensis</i> ." <i>Infect Immun</i> 71(8): 4278-4288.	2
Kaaroud, H., et al. (2003). "Visceral leishmaniasis in a patient with sicca syndrome and nephropathy." <i>Saudi J Kidney Dis Transpl</i> 14(4): 526-529.	3
Kager, P. A. and P. H. Rees (1986). "Haematological investigations in visceral leishmaniasis." <i>Trop Geogr Med</i> 38(4): 371-379.	3
Kaltsogianni, F., et al. (2017). "Norwegian or Crusted Sarcoptic Mange in Two Leishmanial Dogs." <i>J Am Anim Hosp Assoc</i> 53(6): 326-330.	3
Kar, K. (1995). "Serodiagnosis of leishmaniasis." <i>Crit Rev Microbiol</i> 21(2): 123-152.	1
Katakura, K. and A. Kobayashi (1988). "Acid phosphatase activity of virulent and avirulent clones of <i>Leishmania donovani</i> promastigotes." <i>Infect Immun</i> 56(11): 2856-2860.	3
Kaur, A., et al. (2016). "Epidemiological and immunopathological studies on Porcine parvovirus infection in Punjab." <i>Vet World</i> 9(8): 827-831.	3
Kebede, N., et al. (2013). "Multilocus microsatellite signature and identification of specific molecular markers for <i>Leishmania aethiops</i> ." <i>Parasit Vectors</i> 6: 160.	2
Kevric, I., et al. (2015). "New World and Old World <i>Leishmania</i> Infections: A Practical Review." <i>Dermatol Clin</i> 33(3): 579-593.	1
Khandelwal, K., et al. (2011). "A patient presenting with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) as a first indicator of HIV infection in India." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 85(1): 64-65.	4
Khandpur, S., et al. (2010). "Oral miltefosine in post-kala-azar dermal leishmaniasis--experience in three cases." <i>Int J Dermatol</i> 49(5): 565-569.	4
Khatri, M. L., et al. (2000). "Cutaneous and paranasal aspergillosis in an immunocompetent patient." <i>Int J Dermatol</i> 39(11): 853-856.	3
Khosravi, A., et al. (2017). "Clinical Features of Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis in a Major Focus, Southeastern Iran, 1994-2014." <i>Iran J Parasitol</i> 12(4): 544-553.	4
Krayter, L., et al. (2015). "The Genetic Relationship between <i>Leishmania aethiops</i> and <i>Leishmania tropica</i> Revealed by Comparing Microsatellite Profiles." <i>PLoS One</i> 10(7): e0131227.	3
Kumar, B., et al. (2009). "Primary laryngeal leishmaniasis: a rare case report." <i>Indian J Pathol Microbiol</i> 52(1): 62-64.	3
Kumar, D., et al. (2009). "The distribution pattern of proliferating cell nuclear antigen in the nuclei of <i>Leishmania donovani</i> ." <i>Microbiology</i> 155(Pt 11): 3748-3757.	3
Kumar, P. V., et al. (2007). "Visceral leishmaniasis: bone marrow biopsy findings." <i>J Pediatr Hematol Oncol</i> 29(2): 77-80.	3
Laskay, T., et al. (1991). "Generation of species-specific DNA probes for <i>Leishmania aethiops</i> ." 2	2

Mol Biochem Parasitol 44(2): 279-286.	
Le Blancq, S. M., et al. (1986). "Leishmania in the Old World: 3. The distribution of <i>L. aethiopica</i> zymodemes." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 80(3): 360-366.	4
Leon, L. L., et al. (1990). "Antigenic differences of <i>Leishmania amazonensis</i> isolates causing diffuse cutaneous leishmaniasis." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 84(5): 678-680.	2
Leon, L. L., et al. (1992). "Antigenic differences among <i>Leishmania amazonensis</i> isolates and their relationship with distinct clinical forms of the disease." <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 87(2): 229-234.	2
Leopoldo, P. T., et al. (2006). "Differential effects of antigens from <i>L. braziliensis</i> isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production." <i>BMC Infect Dis</i> 6: 75.	3
Lievin-Le Moal, V. and P. M. Loiseau (2016). "Leishmania hijacking of the macrophage intracellular compartments." <i>Febs j</i> 283(4): 598-607.	1
Liew, F. Y. (1983). "Specific suppression of responses to <i>Leishmania tropica</i> by a cloned T-cell line." <i>Nature</i> 305(5935): 630-632.	2
Liew, F. Y. (1986). "Cell-mediated immunity in experimental cutaneous Leishmaniasis." <i>Parasitol Today</i> 2(10): 264-270.	1
Lira, R., et al. (1997). " <i>Leishmania mexicana</i> : binding of promastigotes to type I collagen." <i>Exp Parasitol</i> 85(2): 149-157.	4
Lopes, A. H. and D. McMahon-Pratt (1989). "Monoclonal antibodies specific for members of the genus <i>Endotrypanum</i> ." <i>J Protozool</i> 36(4): 354-361.	3
Lopez Aventin, D., et al. (2014). "Immune reconstitution-associated cutaneous sarcoid-like eruption in a patient with previous disseminated cutaneous leishmaniasis: a diagnostic challenge." <i>J Dermatol</i> 41(7): 648-649.	3
Lovelace, J. K. and M. Gottlieb (1986). "Comparison of extracellular acid phosphatases from various isolates of <i>Leishmania</i> ." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 35(6): 1121-1128.	3
Lucas, C. M., et al. (1998). "Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 59(2): 312-317.	4
Lupi, A., et al. (2006). "Diffuse metabolic activation of reticuloendothelium on F-18 FDG PET imaging in a case of visceral leishmania." <i>Clin Nucl Med</i> 31(1): 34-36.	3
Magnol, J. P., et al. (1995). "[Malignant lymphoma with medium-sized macronucleolated cells in the dog: involvement of an original cell from the marginal zone of the reactive lymph node]." <i>Bull Acad Natl Med</i> 179(1): 51-65.	3
Mah, E. M., et al. (2011). "Disseminated leishmaniasis in a four-year-old child in Yaounde, Cameroon." <i>Turk J Pediatr</i> 53(2): 202-205.	4
Mahe, A., et al. (1996). "Erythrodermic diffuse cutaneous leishmaniasis with Sezary syndrome." <i>Lancet</i> 348(9024): 405-406.	4
Mancheno-Valencia, A., et al. (2017). "[Case report: disseminated cutaneous leishmaniasis (LCD)]." <i>Gac Med Mex</i> 153(2): 251-254.	3
Manfredi, R., et al. (2008). "Diffuse cutaneous dissemination of visceral leishmaniasis during human immunodeficiency virus (HIV) infection, despite negligible immunodeficiency: repeated failure of liposomal amphotericin B administration, followed by successful long-term pentamidine and paromomycin administration." <i>Int J Antimicrob Agents</i> 31(6): 590-592.	4
Manfredi, R., et al. (2008). "Diffuse skin spread of HIV-associated visceral leishmaniasis: cumbersome diagnostic and therapeutic issues." <i>G Ital Dermatol Venereol</i> 143(5): 339-346.	4
Mansour, L., et al. (1993). "A histopathological study of different clinical forms of cutaneous leishmaniasis." <i>J Egypt Soc Parasitol</i> 23(2): 591-597.	3
Marcussen, N., et al. (1989). "Interstitial nephritis and glomerulonephritis in visceral leishmaniasis in a dog. A case report." <i>APMIS</i> 97(12): 1137-1140.	3
Marovt, M., et al. (2010). "Cutaneous leishmaniasis: A case report." <i>Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat</i> 19(2): 41-43.	4
Marquez, M., et al. (2013). " <i>Leishmania</i> amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog." <i>J Vet Diagn Invest</i> 25(1): 142-146.	4
Martinez, D. Y., et al. (2018). "Tegumentary leishmaniasis and coinfections other than HIV." <i>PLoS Negl Trop Dis</i> 12(3): e0006125.	1
Martinez, E., et al. (2002). "Co-infection by <i>Leishmania amazonensis</i> and <i>L. infantum/L. chagasi</i> in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 96(5): 529-532.	4
Masood, S., et al. (2012). "Infiltrated leishmaniasis recidivans cutis on the face: a rare clinical presentation." <i>Trop Doct</i> 42(2): 120-121.	3
Matera, G., et al. (2018). "Depression of lymphocyte activity during cutaneous leishmaniasis: a	3

case report." <i>Diagn Microbiol Infect Dis</i> 92(3): 230-234.	
Mathur, A., et al. (2011). "Diffuse mucocutaneous leishmaniasis." <i>J Assoc Physicians India</i> 59: 653.	4
Matos, D. S., et al. (2005). "Differential interferon- gamma production characterizes the cytokine responses to <i>Leishmania</i> and <i>Mycobacterium leprae</i> antigens in concomitant mucocutaneous leishmaniasis and lepromatous leprosy." <i>Clin Infect Dis</i> 40(2): e5-12.	3
McKinney, L. A. and L. D. Hendricks (1980). "Experimental infection of <i>Mystromys albicaudatus</i> with <i>Leishmania braziliensis</i> : pathology." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 29(5): 753-760.	2
Mehta, V., et al. (2009). "Diffuse cutaneous leishmaniasis in HIV." <i>Dermatol Online J</i> 15(4): 9.	3
Melby, P. C., et al. (1992). "Cutaneous leishmaniasis: review of 59 cases seen at the National Institutes of Health." <i>Clin Infect Dis</i> 15(6): 924-937.	4
Melo, F., et al. (2008). "Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> ." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 79(2): 198-204.	3
Melo, M. N., et al. (2001). "Influence of lysates of the salivary glands of <i>Lutzomyia longipalpis</i> on the development of a <i>Leishmania</i> -major-like parasite in the skin of the golden hamster." <i>Ann Trop Med Parasitol</i> 95(1): 59-68.	2
Mendes Wanderley, J. L., et al. (2012). "Subversion of Immunity by <i>Leishmania amazonensis</i> Parasites: Possible Role of Phosphatidylserine as a Main Regulator." <i>J Parasitol Res</i> 2012: 981686.	1
Mendes, D. S., et al. (2013). "Inflammation in disseminated lesions: an analysis of CD4+, CD20+, CD68+, CD31+ and vW+ cells in non-ulcerated lesions of disseminated leishmaniasis." <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 108(1): 18-22.	3
Menez, C., et al. (2007). "Inward translocation of the phospholipid analogue miltefosine across Caco-2 cell membranes exhibits characteristics of a carrier-mediated process." <i>Lipids</i> 42(3): 229-240.	3
Mengistu, G., et al. (1990). "The value of a direct agglutination test in the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Ethiopia." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 84(3): 359-362.	4
Mengistu, G., et al. (1992). "Comparison of parasitological and immunological methods in the diagnosis of leishmaniasis in Ethiopia." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 86(2): 154-157.	4
Mengistu, G., et al. (1992). "Cutaneous leishmaniasis in south-western Ethiopia: Ocholo revisited." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 86(2): 149-153.	4
Mengistu, G., et al. (1992). "Immunoblot analysis of sera from Ethiopian cutaneous leishmaniasis by antibody class." <i>Scand J Immunol Suppl</i> 11: 149-152.	4
Meziou, T. J., et al. (2008). "[Disseminated cutaneous leishmaniasis secondary to lymphoedema: two cases]." <i>Ann Dermatol Venereol</i> 135(2): 123-126.	4
Miguel, D. C., et al. (2008). "Tamoxifen is effective in the treatment of <i>Leishmania amazonensis</i> infections in mice." <i>PLoS Negl Trop Dis</i> 2(6): e249.	2
Mimori, T., et al. (2002). "Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World." <i>Acta Trop</i> 81(3): 197-202.	4
Miranda, L. H., et al. (2010). "Comparative histopathological study of sporotrichosis and American tegumentary leishmaniasis in dogs from Rio de Janeiro." <i>J Comp Pathol</i> 143(1): 1-7.	2
Miranda, M. M., et al. (2015). "Kaurenoic Acid Possesses Leishmanicidal Activity by Triggering a NLRP12/IL-1beta/cNOS/NO Pathway." <i>Mediators Inflamm</i> 2015: 392918.	2
Misle, J. A., et al. (1985). "Solubilization and partial purification of a cell surface component of <i>Leishmania braziliensis</i> ." <i>Z Parasitenkd</i> 71(4): 419-428.	2
Mokhtari, F. and N. Poostiyan (2018). "Subcorneal Pustular Dermatitis: A Case Report of a Patient with Diffuse Scleroderma." <i>Adv Biomed Res</i> 7: 83.	3
Mokni, M., et al. (2011). "[Histology of cutaneous leishmaniasis]." <i>Ann Dermatol Venereol</i> 138(4): 354-356.	1
Momo, C., et al. (2014). "Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis." <i>Vet Med Int</i> 2014: 150582.	3
Monroy-Ostria, A., et al. (1994). "Infection of BALB/c, C57B1/6 mice and F1 hybrid CB6F1 mice with strains of <i>Leishmania mexicana</i> isolated from Mexican patients with localized or diffuse cutaneous leishmaniasis." <i>Arch Med Res</i> 25(4): 401-406.	2
Monroy-Ostria, A., et al. (1997). "Seroepidemiological studies of cutaneous leishmaniasis in the Campeche state of Mexico." <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 92(1): 21-26.	4
Monroy-Ostria, A., et al. (2014). "ITS1 PCR-RFLP Diagnosis and Characterization of <i>Leishmania</i> in Clinical Samples and Strains from Cases of Human Cutaneous Leishmaniasis in States of the	4

Mexican Southeast." Interdiscip Perspect Infect Dis 2014: 607287.	
Moraes, M. A. and F. T. Silveira (1994). "[Histopathology of the localized form of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Leishmania) amazonensis]." Rev Inst Med Trop Sao Paulo 36(5): 459-463.	3
Morrison, B., et al. (2010). "Diffuse (anergic) cutaneous leishmaniasis responding to amphotericin B." Clin Exp Dermatol 35(4): e116-119.	4
Morsy, T. A., et al. (1990). "Histocompatibility (HLA) antigens in Egyptians with two parasitic skin diseases (scabies and leishmaniasis)." J Egypt Soc Parasitol 20(2): 565-572.	5
Morsy, T. A., et al. (1997). "Leishmania major in an Egyptian patient manifested as diffuse cutaneous leishmaniasis." J Egypt Soc Parasitol 27(1): 205-210.	4
Mozos, E., et al. (1999). "Leishmaniosis and generalized demodicosis in three dogs: a clinicopathological and immunohistochemical study." J Comp Pathol 120(3): 257-268.	3
Munir, A., et al. (2008). "Clinical efficacy of intramuscular meglumine antimoniate alone and in combination with intralesional meglumine antimoniate in the treatment of old world cutaneous leishmaniasis." Acta Dermatovenerol Croat 16(2): 60-64.	4
Murase, L. S., et al. (2018). "The role of metalloproteases in Leishmania species infection in the New World: a systematic review." Parasitology 145(12): 1499-1509.	1
Murdaca, G., et al. (2000). "[Liposomal Amphotericin B for treatment of acute phase and secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in a HIV positive patient]." Infez Med 8(4): 241-244.	3
Nabavi, N. S., et al. (2016). "Adult Onset of Xanthelasmoid Mastocytosis: Report of a Rare Entity." Indian J Dermatol 61(4): 468.	3
Navarro, J. A., et al. (2010). "Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniosis." J Comp Pathol 143(4): 297-302.	2
Ndiaye, P. B., et al. (1996). "[Diffuse cutaneous leishmaniasis and acquired immunodeficiency syndrome in a Senegalese patient]." Bull Soc Pathol Exot 89(4): 282-286.	3
Neva, F. A., et al. (1984). "Observations on local heat treatment for cutaneous leishmaniasis." Am J Trop Med Hyg 33(5): 800-804.	4
Niamba, P., et al. (2006). "[Cutaneous leishmania in HIV patient in Ouagadougou: clinical and therapeutic aspects]." Ann Dermatol Venereol 133(6-7): 537-542.	4
Niamba, P., et al. (2007). "Diffuse cutaneous leishmaniasis in an HIV-positive patient in western Africa." Australas J Dermatol 48(1): 32-34.	4
Nico, D., et al. (2014). "Cross-Protective Immunity to Leishmania amazonensis is Mediated by CD4+ and CD8+ Epitopes of Leishmania donovani Nucleoside Hydrolase Terminal Domains." Front Immunol 5: 189.	2
Nico, D., et al. (2014). "Leishmania donovani Nucleoside Hydrolase Terminal Domains in Cross-Protective Immunotherapy Against Leishmania amazonensis Murine Infection." Front Immunol 5: 273.	2
Nogueira, P. M., et al. (2016). "Lipophosphoglycans from Leishmania amazonensis Strains Display Immunomodulatory Properties via TLR4 and Do Not Affect Sand Fly Infection." PLoS Negl Trop Dis 10(8): e0004848.	2
Norsworthy, N. B., et al. (2004). "Sand fly saliva enhances Leishmania amazonensis infection by modulating interleukin-10 production." Infect Immun 72(3): 1240-1247.	2
Novais, F. O., et al. (2009). "Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against Leishmania braziliensis infection." J Immunol 183(12): 8088-8098.	2
Novais, F. O., et al. (2013). "Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis." PLoS Pathog 9(7): e1003504.	2
Nutter, D. B., et al. (2007). "Measurement of sound power and absorption in reverberation chambers using energy density." J Acoust Soc Am 121(5 Pt1): 2700-2710.	3
Ogawa, M. M., et al. (2006). "Disseminated cutaneous leishmaniasis, an emerging form of cutaneous leishmaniasis: report of two cases." Int J Dermatol 45(7): 869-871.	3
Ogunkolade, B. W., et al. (1990). "Interactions between the human monocytic leukaemia THP-1 cell line and Old and New World species of Leishmania." Acta Trop 47(3): 171-176.	3
Okelo, G. B., et al. (1991). "The treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis: a report of two cases." East Afr Med J 68(1): 67-68.	4
Olekhnovitch, R., et al. (2014). "Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during Leishmania infection." J Clin Invest 124(4): 1711-1722.	2
Olivo Freitas, C., et al. (2018). First Case of Diffuse Leishmaniasis Associated With Leishmania	4

panamensis. Open Forum Infect Dis, Oxford University Press US.	
Ordaz-Farias, A., et al. (2013). "Case report: Transient success using prolonged treatment with miltefosine for a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis infected with <i>Leishmania mexicana mexicana</i> ." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 88(1): 153-156.	4
Ordeix, L., et al. (2017). "Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniosis." <i>Parasit Vectors</i> 10(1): 121.	2
Ordeix, L., et al. (2018). "Histological and Immunological Description of the Leishmanin Skin Test in Ibizan Hounds." <i>J Comp Pathol</i> 158: 56-65.	3
Orlandi, E. M. and A. Malfitano (2014). "Visceral leishmaniasis mimicking Richter transformation." <i>Leuk Lymphoma</i> 55(12): 2952-2954.	3
Oryan, A., et al. (2013). "Genetic diversity of <i>Leishmania major</i> strains isolated from different clinical forms of cutaneous leishmaniasis in southern Iran based on minicircle kDNA." <i>Infect Genet Evol</i> 19: 226-231.	4
Osakwe, N. M., et al. (2013). "Visceral leishmaniasis with associated immune dysregulation leading to lymphoma." <i>Mil Med</i> 178(3): e386-389.	3
Oskam, L., et al. (1999). "Evaluation of the direct agglutination test (DAT) using freeze-dried antigen for the detection of anti- <i>Leishmania</i> antibodies in stored sera from various patient groups in Ethiopia." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 93(3): 275-277.	4
Osland, A., et al. (1992). "Isolation and characterization of recombinant antigens from <i>Leishmania aethiops</i> that react with human antibodies." <i>Infect Immun</i> 60(4): 1368-1374.	4
Oster-Schmidt, C. (2007). "[Comment on: "Photodynamic treatment of cutaneous leishmaniasis"]." <i>J Dtsch Dermatol Ges</i> 5(7): 629; author reply 629.	1
Padron-Nieves, M., et al. (2014). "Correlation between glucose uptake and membrane potential in <i>Leishmania</i> parasites isolated from DCL patients with therapeutic failure: a proof of concept." <i>Parasitol Res</i> 113(6): 2121-2128.	2
Paes, L. S., et al. (2008). "Active transport of glutamate in <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ." <i>J Eukaryot Microbiol</i> 55(5): 382-387.	2
Paladi Cde, S., et al. (2012). "In vitro and in vivo activity of a palladacycle complex on <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ." <i>PLoS Negl Trop Dis</i> 6(5): e1626.	2
Pan, A. A. and D. McMahon-Pratt (1988). "Monoclonal antibodies specific for the amastigote stage of <i>Leishmania pifanoi</i> . I. Characterization of antigens associated with stage- and species-specific determinants." <i>J Immunol</i> 140(7): 2406-2414.	3
Paniz Mondolfi, A. E., et al. (2013). "Intermediate/borderline disseminated cutaneous leishmaniasis." <i>Int J Dermatol</i> 52(4): 446-455.	3
Paradisi, A., et al. (2005). "Atypical multifocal cutaneous leishmaniasis in an immunocompetent patient treated by liposomal amphotericin B." <i>J Infect</i> 51(5): e261-264.	4
Patrao, N. A., et al. (2015). "Diffuse cutaneous leishmaniasis in coexistence with leprosy." <i>Int J Dermatol</i> 54(12): 1402-1406.	4
Pena, M. T., et al. (2000). "Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998)." <i>Vet Ophthalmol</i> 3(1): 35-41.	2
Peralta, M. F., et al. (2018). "Effect of Anti- <i>Leishmania</i> Drugs on the Structural and Elastic Properties of Ultradeformable Lipid Membranes." <i>J Phys Chem B</i> 122(29): 7332-7339.	3
Pereira Ede, F., et al. (2008). "Molecular diagnosis of leishmaniosis in the Parana state of southern Brazil." <i>Exp Dermatol</i> 17(12): 1024-1030.	4
Pereira, L. I., et al. (2009). "Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/ <i>Leishmania</i> antigens." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 81(3): 378-383.	4
Perez, C., et al. (2006). "[Diffuse cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS]." <i>Biomedica</i> 26(4): 485-497.	4
Perez, H., et al. (1978). "Comparative study of American cutaneous leishmaniasis and diffuse cutaneous leishmaniasis in two strains of inbred mice." <i>Infect Immun</i> 22(2): 301-307.	2
Perez-Vega, J. H., et al. (2009). "[Cutaneous leishmaniasis caused by <i>Leishmania mexicana</i> in Durango, Mexico: first clinical case report]." <i>Gac Med Mex</i> 145(5): 433-435.	3
Perruolo, G., et al. (2006). "Isolation of <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> from <i>Lutzomyia spinicrassa</i> (species group <i>Verrucarum</i>) Morales Osorno Mesa, Osorno and Hoyos 1969, in the Venezuelan Andean region." <i>Parasite</i> 13(1): 17-22.	4

Peters, W., et al. (1981). "Potentiating action of rifampicin and isoniazid against <i>Leishmania mexicana amazonensis</i> ." <i>Lancet</i> 1(8230): 1122-1124.	4
Peyron-Raison, N., et al. (1996). "[Cutaneous leishmaniasis]." <i>Rev Prat</i> 46(13): 1623-1627.	1
Pillai, A. B., et al. (2012). "Sphingolipid degradation in <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ." <i>PLoS Negl Trop Dis</i> 6(12): e1944.	2
Pinheiro, A. C., et al. (2011). "Synthesis, cytotoxicity, and in vitro antileishmanial activity of mono-t-butylloxycarbonyl-protected diamines." <i>Diagn Microbiol Infect Dis</i> 71(3): 273-278.	2
Pinheiro, R. O., et al. (2004). "The T-cell anergy induced by <i>Leishmania amazonensis</i> antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis." <i>An Acad Bras Cienc</i> 76(3): 519-527.	2
Pinheiro, R. O., et al. (2005). "TGF-beta-associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with <i>Leishmania amazonensis</i> antigens." <i>Microbes Infect</i> 7(13): 1317-1323.	2
Pinto, A. J., et al. (2015). "Glycol methacrylate embedding for the histochemical study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with <i>Leishmania infantum</i> ." <i>Eur J Histochem</i> 59(4): 2546.	3
Pinto-da-Silva, L. H., et al. (2005). "The 3A1-La monoclonal antibody reveals key features of <i>Leishmania (L) amazonensis</i> metacyclic promastigotes and inhibits procyclics attachment to the sand fly midgut." <i>Int J Parasitol</i> 35(7): 757-764.	3
Poli, A., et al. (1991). "Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study." <i>Nephron</i> 57(4): 444-452.	3
Poulter, L. W. (1980). "Mechanisms of immunity to leishmaniasis. II. Significance of the intramacrophage localization of the parasite." <i>Clin Exp Immunol</i> 40(1): 25-35.	3
Pratlong, F., et al. (1989). "[Simultaneous presence in dogs of 2 zymodemes of the <i>Leishmania infantum</i> complex]." <i>Ann Parasitol Hum Comp</i> 64(4): 312-314.	3
Puig, L. and R. Pradinaud (2003). "Leishmania and HIV co-infection: dermatological manifestations." <i>Ann Trop Med Parasitol</i> 97 Suppl 1: 107-114.	1
Purohit, H. M., et al. (2012). "Diffuse cutaneous leishmaniasis - A rare cutaneous presentation in an HIV-positive patient." <i>Indian J Sex Transm Dis AIDS</i> 33(1): 62-64.	4
Quinonez-Diaz, L., et al. (2012). "Effect of ambient temperature on the clinical manifestations of experimental diffuse cutaneous leishmaniasis in a rodent model." <i>Vector Borne Zoonotic Dis</i> 12(10): 851-860.	2
Rabello, F. E. (1970). "[Diffuse cutaneous leishmaniasis]." <i>An Bras Dermatol</i> 45(2): 147-152.	1
Rabito, M. F., et al. (2014). "In vitro and in vivo antileishmania activity of sesquiterpene lactone-rich dichloromethane fraction obtained from <i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Schultz-Bip." <i>Exp Parasitol</i> 143: 18-23.	4
Ramesh, V., et al. (2007). "An unusual presentation of post-kala-azar dermal leishmaniasis." <i>Trop Doct</i> 37(3): 172-173.	3
Ramos-Martinez, E., et al. (2013). "Effect of 1,25(OH)2D3 on BALB/c mice infected with <i>Leishmania mexicana</i> ." <i>Exp Parasitol</i> 134(4): 413-421.	2
Rathi, S. K., et al. (2005). "Post-kala-azar dermal leishmaniasis: a histopathological study." <i>Indian J Dermatol Venereol Leprol</i> 71(4): 250-253.	3
Ready, P. D., et al. (1983). "Leishmaniasis in Brazil: XX. Prevalence of "enzootic rodent leishmaniasis" (<i>Leishmania mexicana amazonensis</i>), and apparent absence of "pian bois" (<i>Le. braziliensis guyanensis</i>), in plantations of introduced tree species and in other non-climax forests in eastern Amazonia." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 77(6): 775-785.	4
Reis, M. L., et al. (2010). "Murine immune response induced by <i>Leishmania major</i> during the implantation of paraffin tablets." <i>Virchows Arch</i> 457(5): 609-618.	2
Rigo, R. S., et al. (2013). "Renal histopathological findings in dogs with visceral leishmaniasis." <i>Rev Inst Med Trop Sao Paulo</i> 55(2): 113-116.	3
Rincon, M. Y., et al. (2009). "[A report of two cases of disseminated cutaneous leishmaniasis in Santander, Colombia]." <i>Rev Salud Publica (Bogota)</i> 11(1): 145-150.	3
Ritter, U. and H. Korner (2002). "Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis." <i>Parasite Immunol</i> 24(6): 295-301.	1
Ritter, U. and H. Moll (2000). "Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of leishmania major by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4." <i>Eur J Immunol</i> 30(11): 3111-3120.	2
Roberts, M., et al. (1989). "Influence of Lsh, H-2, and an H-11-linked gene on visceralization and metastasis associated with <i>Leishmania mexicana</i> infection in mice." <i>Infect Immun</i> 57(3): 875-881.	2

Rocha Filho, F. D., et al. (2000). "Bone marrow fibrosis (pseudo-myelofibrosis) in human kala-azar." <i>Rev Soc Bras Med Trop</i> 33(4): 363-366.	3
Rocha, M. N., et al. (2013). "Cytotoxicity and In Vitro Antileishmanial Activity of Antimony (V), Bismuth (V), and Tin (IV) Complexes of Lapachol." <i>Bioinorg Chem Appl</i> 2013: 961783.	2
Rodenko, B., et al. (2007). "2,N6-disubstituted adenosine analogs with antitrypanosomal and antimalarial activities." <i>Antimicrob Agents Chemother</i> 51(11): 3796-3802.	3
Rodrigues, J. C., et al. (2014). "Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure." <i>Subcell Biochem</i> 74: 1-42.	1
Rodriguez, G., et al. (2015). "Histoid leprosy with giant lesions of fingers and toes." <i>Biomedica</i> 35(2): 165-170.	3
Rojas, E. and J. V. Scorza (1991). "[Metacyclics of <i>Leishmania mexicana</i> in the hypopharynx of <i>Lutzomyia youngi</i> experimentally infected]." <i>Parassitologia</i> 33 Suppl: 493-500.	2
Rotureau, B. (2006). "Ecology of the leishmania species in the Guianan ecoregion complex." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 74(1): 81-96.	4
Sadeghian, G., et al. (2005). "Disseminated cutaneous leishmaniasis on lymphedema following radiotherapy." <i>Int J Dermatol</i> 44(7): 610-611.	3
Saldanha, A. C., et al. (1992). "[The origin of patients who are carriers of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the state of Maranhao, Brazil]." <i>Rev Soc Bras Med Trop</i> 25(4): 271-273.	4
Saldanha, A. C., et al. (1995). "[Bone alterations observed in diffuse cutaneous leishmaniasis in the State of Maranhao]." <i>Rev Soc Bras Med Trop</i> 28(1): 55-56.	4
Saleem, K., et al. (2007). "Histological grading patterns in patients of cutaneous leishmaniasis." <i>J Coll Physicians Surg Pak</i> 17(11): 650-653.	4
Salman, S. M., et al. (1999). "Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis." <i>Clin Dermatol</i> 17(3): 291-296.	1
Salomon, O. D., et al. (2001). "[Epidemic outbreak of tegumentary leishmaniasis in Puerto Esperanza, Misiones, 1998]." <i>Medicina (B Aires)</i> 61(4): 385-390.	4
Sampaio, R. N., et al. (2002). "[American cutaneous leishmaniasis associated with HIV/AIDS: report of four clinical cases]." <i>Rev Soc Bras Med Trop</i> 35(6): 651-654.	4
Sanguenza, O. P., et al. (1993). "Mucocutaneous leishmaniasis: a clinicopathologic classification." <i>J Am Acad Dermatol</i> 28(6): 927-932.	4
Sartori, A., et al. (1987). "Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar." <i>Parasite Immunol</i> 9(1): 93-103.	3
Sasani, F., et al. (2016). "Canine cutaneous leishmaniasis." <i>J Parasit Dis</i> 40(1): 57-60.	2
Schacht, V. and A. Kapp (2011). "[Inflammatory dermatoses]." <i>Pathologe</i> 32(5): 384-390.	1
Schilstra, A., et al. (2006). "Case studies to explore the pitfalls in the diagnosis of sarcoidosis." <i>Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis</i> 23(2): 135-140.	3
Schnur, L. F., et al. (1983). "On the identity of the parasite causing diffuse cutaneous leishmaniasis in the Dominican Republic." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 77(6): 756-762.	4
Schurr, E., et al. (1987). "Electron microscopical studies on cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. II. Parasite and host cell differences between the localized and the diffuse form." <i>Acta Trop</i> 44(4): 395-407.	5
Schurr, E., et al. (1986). "Cutaneous leishmaniasis in Ethiopia: I. Lymphocyte transformation and antibody titre." <i>Trop Med Parasitol</i> 37(4): 403-408.	5
Schonian, G., et al. (2000). "Genetic variability within the species <i>Leishmania aethiops</i> does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis." <i>Mol Biochem Parasitol</i> 106(2): 239-248.	4
Schraner, C., et al. (2005). "Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1." <i>Clin Infect Dis</i> 40(12): e120-124.	3
Schriefer, A., et al. (2009). "Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil." <i>Emerg Infect Dis</i> 15(6): 871-876.	3
Schroeder, J. and T. Aebischer (2009). "Recombinant outer membrane vesicles to augment antigen-specific live vaccine responses." <i>Vaccine</i> 27(48): 6748-6754.	3
Scorza, B. M., et al. (2017). "Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis." <i>Int J Mol Sci</i> 18(6).	1
Serarslan, G. and M. Aksakal (2015). "Cutaneous leishmaniasis mimicking granulomatous cheilitis and treated successfully with oral fluconazole in a boy." <i>Ann Parasitol</i> 61(3): 197-199.	3
Sereno, D. and J. L. Lemesre (1997). "Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model	3

for investigation of antileishmanial agents." <i>Antimicrob Agents Chemother</i> 41(5): 972-976.	
Serezani, C. H., et al. (2002). "Evaluation of the murine immune response to <i>Leishmania</i> meta 1 antigen delivered as recombinant protein or DNA vaccine." <i>Vaccine</i> 20(31-32): 3755-3763.	2
Sharquie, K. E. and A. F. Hameed (2012). "Panniculitis is an important feature of cutaneous leishmaniasis pathology." <i>Case Rep Dermatol Med</i> 2012: 612434.	3
Sharquie, K. E. and R. A. Najim (2004). "Disseminated cutaneous leishmaniasis." <i>Saudi Med J</i> 25(7): 951-954.	3
Sharquie, K. E., et al. (2016). "Panniculitis is a common unrecognized histopathological feature of cutaneous leishmaniasis." <i>Indian J Pathol Microbiol</i> 59(1): 16-19.	4
Shaw, B. A., et al. (1987). "Experimental murine infection with the diffuse cutaneous leishmaniasis strain, Isabel." <i>Ann Trop Med Parasitol</i> 81(1): 9-14.	2
Shaw, J., et al. (2015). "Characterization of <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) waltoni n.sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), the Parasite Responsible for Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in the Dominican Republic." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 93(3): 552-558.	3
Shirian, S., et al. (2014). "Comparison of conventional, molecular, and immunohistochemical methods in diagnosis of typical and atypical cutaneous leishmaniasis." <i>Arch Pathol Lab Med</i> 138(2): 235-240.	3
Sienkiewicz, N., et al. (2010). "Trypanosoma brucei pteridine reductase 1 is essential for survival in vitro and for virulence in mice." <i>Mol Microbiol</i> 77(3): 658-671.	3
Silva-Almeida, M., et al. (2010). " <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) amazonensis infection: Muscular involvement in BALB/c and C3H.HeN mice." <i>Exp Parasitol</i> 124(3): 315-318.	2
Silveira, F. T., et al. (2005). "Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) amazonensis." <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 100(5): 525-534.	3
Silveira, F. T., et al. (2009). "Immunopathogenic competences of <i>Leishmania</i> (V.) braziliensis and L. (L.) amazonensis in American cutaneous leishmaniasis." <i>Parasite Immunol</i> 31(8): 423-431.	1
Singh, A., et al. (2015). "Histopathological characteristics of post kala-azar dermal leishmaniasis: a series of 88 patients." <i>Indian J Dermatol Venereol Leprol</i> 81(1): 29-34.	3
Singh, S. (2014). "Changing trends in the epidemiology, clinical presentation, and diagnosis of <i>Leishmania</i> -HIV co-infection in India." <i>Int J Infect Dis</i> 29: 103-112.	1
Sinha, S., et al. (2008). "Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome." <i>Int J Dermatol</i> 47(12): 1263-1270.	4
Sipahi, T., et al. (2005). "Visceral leishmaniasis and pseudomonas septicemia associated with hemophagocytic syndrome and myelodysplasia in a Turkish child." <i>Turk J Pediatr</i> 47(2): 191-194.	2
Sohl, S., et al. (2007). "Photodynamic treatment of cutaneous leishmaniasis." <i>J Dtsch Dermatol Ges</i> 5(2): 128-130.	3
Soliman, M. F. (2006). "The persistence, dissemination, and visceralization tendency of <i>Leishmania major</i> in Syrian hamsters." <i>Acta Trop</i> 97(2): 146-150.	2
Soong, L. (2012). "Subversion and Utilization of Host Innate Defense by <i>Leishmania amazonensis</i> ." <i>Front Immunol</i> 3: 58.	1
Sosa-Estani, S., et al. (2000). "Tegumentary leishmaniasis in Northern Argentina: distribution of infection and disease, in three municipalities of Salta, 1990-1992." <i>Rev Soc Bras Med Trop</i> 33(6): 573-582.	3
Soto, J. and P. Soto (2006). "[Oral miltefosine to treat leishmaniasis]." <i>Biomedica</i> 26 Suppl 1: 207-217.	1
Soto, J. and P. Soto (2006). "Miltefosine: oral treatment of leishmaniasis." <i>Expert Rev Anti Infect Ther</i> 4(2): 177-185.	4
Sotto, M. N., et al. (1989). "Cutaneous leishmaniasis of the New World: diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa." <i>Acta Trop</i> 46(2): 121-130.	3
Souza, V. L., et al. (2011). "Immune and inflammatory responses to <i>Leishmania amazonensis</i> isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBA mice." <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 106(1): 23-31.	2
Srivastava, S., et al. (2016). "Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis." <i>Parasit Vectors</i> 9(1): 277.	1
Stark, D., et al. (2008). "Leishmaniasis, an emerging imported infection: report of 20 cases from Australia." <i>J Travel Med</i> 15(5): 351-354.	4
Sunderkotter, C., et al. (1993). "Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages in vitro and in vivo." <i>J Immunol</i> 151(9): 4891-	2

Continuação

4901.		
Sundharkrishnan, L. and J. P. North (2017). "Histopathologic features of cutaneous leishmaniasis and use of CD1a staining for amastigotes in Old World and New World leishmaniasis." <i>J Cutan Pathol</i> 44(12): 1005-1011.	4	
Supsrinunjai, C., et al. (2017). "Disseminated Autochthonous Dermal Leishmaniasis Caused by <i>Leishmania siamensis</i> (PCM2 Trang) in a Patient from Central Thailand Infected with Human Immunodeficiency Virus." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 96(5): 1160-1163.	3	
Tafari, W. L., et al. (1989). "[Optical and electron microscopic study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>]." <i>Rev Inst Med Trop Sao Paulo</i> 31(3): 139-145.	3	
Tafari, W. L., et al. (1993). "[Comparative histopathologic study of the skin test in dogs from an endemic area of tegumentary leishmaniasis, using 2 antigens: Leishvacin and P10.000G]." <i>Rev Soc Bras Med Trop</i> 26(1): 11-14.	2	
Tarantino, C., et al. (2001). " <i>Leishmania infantum</i> and <i>Neospora caninum</i> simultaneous skin infection in a young dog in Italy." <i>Vet Parasitol</i> 102(1-2): 77-83.	2	
Tasca, K. I., et al. (2009). "[Parasitological, immunohistochemical and histopathological study for <i>Leishmania chagasi</i> detection in splenic tissues of dogs with visceral leishmaniasis]." <i>Rev Bras Parasitol Vet</i> 18(1): 27-33.	3	
Teixeira, P. C., et al. (2015). "Regulation of <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> protein expression by host T cell dependent responses: differential expression of oligopeptidase B, trypanothione peroxidase and HSP70 isoforms in amastigotes isolated from BALB/c and BALB/c nude mice." <i>PLoS Negl Trop Dis</i> 9(2): e0003411.	2	
Trainor, K. E., et al. (2010). "Eight cases of feline cutaneous leishmaniasis in Texas." <i>Vet Pathol</i> 47(6): 1076-1081.	2	
Tregnago, R., et al. (1993). "The diagnosis of <i>Pneumocystis carinii</i> pneumonia by cytologic evaluation of Papanicolaou and Leishman-stained bronchoalveolar specimens in patients with the acquired immunodeficiency syndrome." <i>Cytopathology</i> 4(2): 77-84.	3	
Tretiakova, M. S. (2018). "Eosinophilic solid and cystic renal cell carcinoma mimicking epithelioid angiomyolipoma: series of 4 primary tumors and 2 metastases." <i>Hum Pathol</i> 80: 65-75.	3	
Turetz, M. L., et al. (2002). "Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil." <i>J Infect Dis</i> 186(12): 1829-1834.	3	
Uezato, H., et al. (1998). "Comparative studies of the detection rates of <i>Leishmania</i> parasites from formalin, ethanol-fixed, frozen human skin specimens by polymerase chain reaction and Southern blotting." <i>J Dermatol</i> 25(10): 623-631.	4	
Ulrich, M., et al. (1988). "Serological patterns and specificity in American cutaneous leishmaniasis." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 39(2): 179-184.	4	
Utaile, M., et al. (2013). "Susceptibility of clinical isolates of <i>Leishmania aethiopica</i> to miltefosine, paromomycin, amphotericin B and sodium stibogluconate using amastigote-macrophage in vitro model." <i>Exp Parasitol</i> 134(1): 68-75.	4	
van der Lugt, J. J., et al. (1992). "Cutaneous leishmaniasis in a sheep." <i>J S Afr Vet Assoc</i> 63(2): 74-77.	2	
van Eys, G. J., et al. (1987). "Detection of <i>Leishmania</i> parasites by DNA in situ hybridization with non-radioactive probes." <i>Parasitol Res</i> 73(3): 199-202.	3	
van Griensven, J., et al. (2016). "Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by <i>Leishmania aethiopica</i> : A Systematic Review." <i>PLoS Negl Trop Dis</i> 10(3): e0004495.	1	
Vanloubbeeck, Y., et al. (2005). "Late cutaneous metastases in C3H SCID mice infected with <i>Leishmania amazonensis</i> ." <i>J Parasitol</i> 91(1): 226-228.	2	
Vasconcellos, C. and M. N. Sotto (1997). "Experimental cutaneous leishmaniasis: transmission electron microscopy of the inoculation site." <i>Int J Exp Pathol</i> 78(2): 81-89.	2	
Velasco, O., et al. (1989). "Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico." <i>Am J Trop Med Hyg</i> 41(3): 280-288.	4	
Velasquez, L. G., et al. (2016). "Distinct courses of infection with <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> are observed in BALB/c, BALB/c nude and C57BL/6 mice." <i>Parasitology</i> 143(6): 692-703.	2	
Velez, I. D., et al. (2015). "Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: Report of 27 Cases." <i>Case Rep Dermatol</i> 7(3): 275-286.	3	
Velez, I., et al. (1994). "Diffuse cutaneous leishmaniasis with mucosal involvement in Colombia, caused by an enzymatic variant of <i>Leishmania panamensis</i> ." <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 88(2): 199.	4	

Continua

Venencie, P. Y., et al. (1993). "[Disseminated cutaneous leishmaniasis in a case of an immunodepressed woman]." <i>Ann Dermatol Venereol</i> 120(6-7): 461-463.	3
Venkataram, M., et al. (2001). "Histopathological spectrum in cutaneous leishmaniasis: a study in Oman." <i>Indian J Dermatol Venereol Leprol</i> 67(6): 294-298.	4
Veress, B., et al. (1986). "Immunohistological investigations in chronic cutaneous leishmaniasis in Saudi Arabia." <i>Trop Geogr Med</i> 38(4): 380-385.	5
Verma, G. K., et al. (2012). "A rare case of diffuse cutaneous leishmaniasis in an immunocompetent patient from sub-Himalayan India." <i>Trop Doct</i> 42(4): 237-239.	4
Vieira, V. R., et al. (2015). "Ecological Aspects of Phlebotomine Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Areas of American Cutaneous Leishmaniasis, in the Municipality of Paraty, Rio de Janeiro, Brazil. I-Index of Abundance by Location and Type of Capture." <i>J Med Entomol</i> 52(5): 886-895.	3
Vieira-Goncalves, R., et al. (2008). "Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> in Paraty, Rio de Janeiro." <i>Int J Dermatol</i> 47(9): 926-932.	3
Von Stebut, E. (2015). "Leishmaniasis." <i>J Dtsch Dermatol Ges</i> 13(3): 191-200; quiz 201.	1
von Stebut, E. and C. Sunderkotter (2007). "[Cutaneous leishmaniasis]." <i>Hautarzt</i> 58(5): 445-458; quiz 459.	1
von Stebut, E., et al. (2012). "[Cutaneous leishmaniasis as travelers' disease. Clinical presentation, diagnostics and therapy]." <i>Hautarzt</i> 63(3): 233-246; quiz 247-238.	1
Wanassen, N., et al. (2008). "Pathogenic role of B cells and antibodies in murine <i>Leishmania amazonensis</i> infection." <i>Int J Parasitol</i> 38(3-4): 417-429.	2
Wermert, D., et al. (1999). "Pulmonary sarcoidosis with cutaneous leishmaniasis." <i>Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis</i> 16(2): 228-229.	5
Xu, B., et al. (2011). "Generalized acoustic energy density." <i>J Acoust Soc Am</i> 130(3): 1370-1380.	3
Yapar, A. F., et al. (2011). "Diffuse splenic F-18 FDG uptake in visceral leishmaniasis." <i>Clin Nucl Med</i> 36(11): 1041-1043.	3
Ysmail-Dahlouk, M., et al. (1994). "[Lupoid leishmaniasis]." <i>Ann Dermatol Venereol</i> 121(2): 103-106.	3
Yurdakul, P. (2005). "[Immunopathogenesis of <i>Leishmania</i> infections]." <i>Mikrobiyol Bul</i> 39(3): 363-381.	1
Yusuf, S. M., et al. (2010). "Disseminated cutaneous leishmaniasis in HIV positive patient--a case report." <i>Niger J Med</i> 19(1): 112-114.	4
Zaar, K., et al. (1982). "Electron microscopical studies on cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. I. The diffuse form and its treatment with pentamidine." <i>Ann Trop Med Parasitol</i> 76(6): 595-605.	4
Zatonskikh, V., et al. (2013). "Evolution of Clinical Manifestations of Neck and Face due to Cutaneous Leishmaniasis Resulting In Diagnostic Errors." <i>Iran J Public Health</i> 42(12): 1472-1475.	3
Zeledon, R. (1992). "Leishmaniasis in the Caribbean Islands. A review." <i>Ann N Y Acad Sci</i> 653: 154-160.	1
Zerpa, O., et al. (2006). "Treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis with miltefosine: a case report." <i>Int J Dermatol</i> 45(6): 751-753.	4
Zerpa, O., et al. (2007). "Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses." <i>Br J Dermatol</i> 156(6): 1328-1335.	4
Zgheib, E., et al. (2016). "Old World Leishmaniasis: an ancient disease with nonstandardized microscopic and clinical classifications." <i>J Cutan Pathol</i> 43(10): 815-820.	4
Zijlstra, E. E. (2014). "PKDL and other dermal lesions in HIV co-infected patients with Leishmaniasis: review of clinical presentation in relation to immune responses." <i>PLoS Negl Trop Dis</i> 8(11): e3258.	1

Nota- Segunda coluna apresenta os motivos de não inclusão, sendo: 1- Estudo não apresenta dados primários; 2- Estudo não inclui Humanos; 3- Estudo não inclui pacientes com LCD; 4- Não se trata de estudo imunológico; 5- Não foi possível obter texto completo do estudo.

8. REFERÊNCIAS

1. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(3):e0004349.
2. Momen H, Cupolillo E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000;95(4):583-8.
3. Wright JH. Protozoa in a case of tropical ulcer ("Delhi sore"). *The Journal of medical research*. 1903;10(3):472.
4. Vale ECSd, Furtado T. Tegumentary leishmaniasis in Brazil: a historical review related to the origin, expansion and etiology. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2005;80(4):421-8.
5. Rabello E. Contribuição ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil. Origens, histórico e sinonímia *Annaes Brasileiros de Dermatologia e Syphilographia*. 1925;1:3-31.
6. Montenegro J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Archives of Dermatology and Syphilology*. 1926;13(2):187-94.
7. Gomes CM, Paula NA, Morais OO, Soares KA, Roselino AM, Sampaio RN. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol*. 2014;89(5):701-9.
8. Costa JML, Saldanha ACR, Silva ACdM, Serra Neto A, Galvão CES, Silva CdMP, et al. Estado atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão: II. Aspectos epidemiológicos, clínico-evolutivos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1992;25(2):115-23.
9. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*. 2012;7(5):e35671.
10. Organization WH. Leishmaniasis 2015 [Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en>].
11. Hotez PJ, Remme JH, Buss P, George G, Morel C, Breman JG. Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clinical infectious diseases*. 2004;38(6):871-8.

12. Velozo D, Cabral A, Ribeiro MCM, Motta JdOCd, Costa IMC, Sampaio RNR. Fatal mucosal leishmaniasis in a child. *An Bras Dermatol*. 2006;81(3):255-9.
13. Luz G, Milan P, Galvão C. New World Mucocutaneous Leishmaniasis with Oral Manifestations: Case Report and Damage Repair. 2014.
14. Costa AAU, Saldanha AC, Leite BM, Ramos B, Junior IA, Noronha AL, et al. Imaging exams of bone lesions in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). *Acta tropica*. 2005;96(1):9-15.
15. Reithinger R, Dujardin J-C, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*. 2007;7(9):581-96.
16. Ministério da Saúde SdVeS, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana atualizada. Editora MS; 2017.
17. Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, Pearson R, Lopez-Velez R, Weina P, et al. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017;96(1):24-45.
18. Galati EA, Nunes VL, Dorval MEC, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA, et al. Study of the phlebotomines (Diptera, Psychodidae), in area of cutaneous leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revista de saude publica*. 1996;30(2):115-28.
19. Azevedo AC, Vilela ML, Souza NA, Andrade-Coelho CA, Barbosa AF, Firmo AL, et al. The sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of a focus of cutaneous leishmaniasis in Ilhéus, state of Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1996;91(1):75-9.
20. Aguiar GMd, Medeiros WMd, De Marco TS, Santos SCd, Gambardella S. Ecology of sandflies in Serra do Mar, Itaguaí, state of Rio de Janeiro, Brazil. I-Sandfly fauna and prevalence of the species in collections sites and method of capture (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Cadernos de saude publica*. 1996;12(2):195-206.
21. Domingos FM, Carreri-Bruno G, Ciaravolo MR, Galati E, Wanderley D, Corrêa F. American tegumentary leishmaniasis: Phlebotominae in an area of disease transmission, the city of Pedro de Toledo, southern region of the state of Sao Paulo, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1998;31(5):425-32.
22. Luz E, Membrive N, Castro E, Dereure J, Pratlong F, Dedet J, et al. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania* (V.) *braziliensis* in Paraná

state, southern Brazil. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 2000;94(6):623-31.

23. Teodoro U, Kühl JB. Interação flebotomíneos, animais domésticos e dominância de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) em área com alto grau de antropia, no Sul do Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 1997;31:512-6.

24. Silveira TGV, Teodoro U, Lonardoni MVC, Guilherme ALF, Toledo MJOd, Ramos M, et al. Epidemiologic aspects of Cutaneous Leishmaniasis in an endemic area of the state of Paraná, Brazil. *Cadernos de saude publica*. 1996;12(2):141-7.

25. Grisard EC, Steindel M, Shaw JJ, Ishikawa EA, Carvalho-Pinto CJ, Eger-Mangrich I, et al. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. *Acta Tropica*. 2000;74(1):89-93.

26. Follador I, Araujo C, Cardoso MA, Tavares-Neto J, Barral AMP, Miranda JC, et al. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil. 1999.

27. Sousa AdQ, Parise ME, Pompeu MM, Coehlo Filho JM, Vasconcelos IA, Lima JWO, et al. Bubonic leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection in Ceara, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1995;53(4):380-5.

28. Balbino VQ, Marcondes CB, Alexander B, Luna LK, Lucena MM, Mendes A, et al. First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *umbratilis* Ward & Frahia, 1977 outside of Amazonian Region, in Recife, State of Pernambuco, Brazil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001;96(3):315-7.

29. Chagas AC, Pessoa FAC, Medeiros JFd, Py-Daniel V, Mesquita ÉC, Balestrassi DA. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em uma vila de exploração de minérios-Pitinga, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2006;9:186-92.

30. de Brito ME, Andrade MS, Dantas-Torres F, Rodrigues EH, Cavalcanti Mde P, de Almeida AM, et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(4):425-9.

31. Guerra JA, Maciel MG, Guerra MV, Talhari AC, Prestes SR, Fernandes MA, et al. Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48 Suppl 1:12-9.

32. da Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* sl.(Antunes & Coutinho, 1939)(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of

American cutaneous leishmaniasis in Brazil Mini-review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2007;102(2):149-53.

33. Lucciola GV, Passos VdA, Patrus A. Mudança no padrão epidemiológico da leishmaniose tegumentar americana. An Bras Dermatol. 1996;71:99-105.

34. WHO. WHO | Leishmaniasis – Disease distribution of new cases in Brazil: World Health Organization; 2017 [updated 2017-12-01 16:34:39. Available from: http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_CP_disease_distribution_BRA_2015/en/.

35. Silveira FT. Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) na Amazônia, Brasil: aspectos clínicos e epidemiológicos. Gazeta médica da Bahia. 2009(79).

36. Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. J Am Acad Dermatol. 1996;34(2 Pt 1):257-72.

37. Bryceson A. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia I. The clinical and histological features of the disease. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1969;63(6):708-37.

38. Alcover MM, Rocamora V, Guillen MC, Berenguer D, Cuadrado M, Riera C, et al. Case Report: Diffuse Cutaneous Leishmaniasis by *Leishmania infantum* in a Patient Undergoing Immunosuppressive Therapy: Risk Status in an Endemic Mediterranean Area. Am J Trop Med Hyg. 2018;98(5):1313-6.

39. Abdel-Hameed AA, Ahmed BO, Mohamedani AA, el-Harith A, Van Eys G. A case of diffuse cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990;84(4):535-6.

40. el-Safi SH, Peters W, el-Toam B, el-Kadarow A, Evans DA. Studies on the leishmaniasis in the Sudan. 2. Clinical and parasitological studies on cutaneous leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1991;85(4):457-64.

41. Develoux M, Diallo S, Dieng Y, Mane I, Huerre M, Pratlong F, et al. Diffuse cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* in Senegal. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996;90(4):396-7.

42. Ndiaye PB, Develoux M, Dieng MT, Huerre M. [Diffuse cutaneous leishmaniasis and acquired immunodeficiency syndrome in a Senegalese patient]. Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990). 1996;89(4):282-6.

43. Mahe A, Gessain A, Huerre M, Pratlong F, Dedet JP. Erythrodermic diffuse cutaneous leishmaniasis with Sezary syndrome. Lancet. 1996;348(9024):405-6.

44. Chaudhary RG, Bilimoria FE, Katare SK. Diffuse cutaneous leishmaniasis: co-infection with human immunodeficiency virus (HIV). *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*. 2008;74(6):641-3.
45. Mehta V, Balachandran C, Rao R, Dil SK, Indusri L. Diffuse cutaneous leishmaniasis in HIV. *Dermatol Online J*. 2009;15(4):9.
46. Purohit HM, Shah AN, Amin BK, Shevkani MR. Diffuse cutaneous leishmaniasis - A rare cutaneous presentation in an HIV-positive patient. *Indian journal of sexually transmitted diseases and AIDS*. 2012;33(1):62-4.
47. Khandelwal K, Bumb RA, Mehta RD, Kaushal H, Lezama-Davila C, Salotra P, et al. A patient presenting with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) as a first indicator of HIV infection in India. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85(1):64-5.
48. Mahesh KU, Yelikar BR, Potekar RMR, Aparna P, Keshav M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in an HIV sero-positive patient-A diagnostic dilemma. *J Interdiscipl Histopathol*. 2012;1(1):45-7.
49. Barnes JC, Stanley O, Craig TM. Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1993;202(3):416-8.
50. Blum-Dominguez SD, Martinez-Vazquez A, Nunez-Oreza LA, Martinez-Hernandez F, Villalobos G, Tamay-Segovia P. [Diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) and visceral leishmaniasis (VL) concurrent with cancer: Presentation of a case]. *Gaceta medica de Mexico*. 2017;153(1):121-4.
51. Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol*. 2010;63(2):309-22.
52. Grimaldi G, Tesh R. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical microbiology reviews*. 1993;6(3):230-50.
53. Shaw J, Pratlong F, Floeter-Winter L, Ishikawa E, El Baidouri F, Ravel C, et al. Characterization of *Leishmania (Leishmania) waltoni* n.sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), the Parasite Responsible for Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in the Dominican Republic. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93(3):552-8.
54. Farrell JP. *Leishmania*: Springer Science & Business Media; 2002.
55. Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cadernos de saude publica*. 2000;16(4):925-50.

56. Barrientos LP. Um caso atípico de leishmaniose cutâneo-mucosa (espúndia). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1948;46(2):415-8.
57. Costa JML, Costa AAUMLd, Elkhoury ANSM, Bezerril ACR, Barral AMP, Saldanha ACR. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. 2009.
58. Martinez E, Mollinedo S, Torrez M, Munoz M, Banuls AL, Le Pont F. Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum*/*L. chagasi* in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96(5):529-32.
59. Velez I, Agudelo S, Robledo S, Jaramillo L, Segura I, Soccol V, et al. Diffuse cutaneous leishmaniasis with mucosal involvement in Colombia, caused by an enzymatic variant of *Leishmania panamensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994;88(2):199.
60. Schnur L, Walton B, Bogaert-Diaz H. On the identity of the parasite causing diffuse cutaneous leishmaniasis in the Dominican Republic. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1983;77(6):756-62.
61. Zeledon R. Leishmaniasis in the Caribbean Islands. A review. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;653:154-60.
62. Hashiguchi Y, Gomez Landires EA. A review of leishmaniasis in Ecuador. *Bulletin of the Pan American Health Organization.* 1991;25(1):64-76.
63. Simpson MH, Mullins JF, Stone OJ. Disseminated anergic cutaneous leishmaniasis: An autochthonous case in Texas and the Mexican States of Tamaulipas and Nuevo Leon. *Archives of dermatology.* 1968;97(3):301-3.
64. Sinha S, Fernandez G, Kapila R, Lambert WC, Schwartz RA. Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. *Int J Dermatol.* 2008;47(12):1263-70.
65. Corrales-Padilla H, Lainez N. Leishmaniasis cutánea diseminada (Revisión del tema e informe del primer caso en Honduras). *Revista Medica Hondureña.* 1968;36:142-8.
66. Missoni E, Morelli R. Survey of 259 cases of American cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1984;87:159-65.
67. Olivo Freitas C, Gundacker ND, Pascale JM, Saldaña A, Diaz-Suarez R, Jimenez G, et al., editors. First Case of Diffuse Leishmaniasis Associated With *Leishmania panamensis*. *Open forum infectious diseases*; 2018: Oxford University Press US.

68. Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Cruz ME, Kreutzer RD, et al. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59(2):312-7.
69. Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2005;100(5):525-34.
70. Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Jr G, Momen H, McMahon-Pratt D, de Jesus AR, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;44(5):536-46.
71. Van der Auwera G, Dujardin JC. Species typing in dermal leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(2):265-94.
72. Gonzalez U, Pinart M, Sinclair D, Firooz A, Enk C, Vélez ID, et al. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2015(8):1.
73. World Health Organization, editor *Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniases. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniases*; 2010: World Health Organization.
74. Reyburn H, Ashford R, Mohsen M, Hewitt S, Rowland M. A randomized controlled trial of insecticide-treated bednets and chaddars or top sheets, and residual spraying of interior rooms for the prevention of cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2000;94(4):361-6.
75. Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert review of anti-infective therapy.* 2010;8(4):419-33.
76. World Health Organization ECotcol. *Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniases. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniases*: World Health Organization; 2010.
77. Puig L, Pradinaud R. *Leishmania* and HIV co-infection: dermatological manifestations. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003;97 Suppl 1:107-14.
78. Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *The Lancet infectious diseases.* 2008;8(3):191-9.

79. Barroso DH, Silva CE, Perdigao e Vasconcelos AC, Cavalcanti SM, Brito ME, Medeiros AC. Post-kala-azar dermal Leishmaniasis in two different clinical contexts. *An Bras Dermatol*. 2015;90(3 Suppl 1):108-10.
80. Rios-Buceta L, Buezo GF, Peñas PF, Dauden-Tello E, Aragües-Montañes M, Fraga-Fernandez J, et al. Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis in an HTV-Patient. *International journal of dermatology*. 1996;35(4):303-4.
81. Jirmanus L, Glesby MJ, Guimaraes LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012;86(3):426-33.
82. Romero GAS, Sampaio RNR, Macêdo VdO, Marsden PD. Sensitivity of lymph node aspiration in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999;94(4):509-11.
83. Lupi O, Belo J, Cunha PR. Rotinas de diagnóstico e tratamento da Sociedade Brasileira de Dermatologia. *Rotinas de diagnóstico e tratamento da Sociedade Brasileira de Dermatologia*2010.
84. Sassi A, Louzir H, Ben Salah A, Mokni M, Ben Osman A, Dellagi K. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. *Clinical & Experimental Immunology*. 1999;116(1):127-32.
85. Shaw J, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1975;69(3):323-35.
86. Luz ZMP, Silva ARd, Silva FdO, Caligiorne RB, Oliveira E, Rabello A. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104(1):62-6.
87. Reis LdC, Brito MEFd, Almeida ÉLd, Félix SM, Medeiros ÂCR, Silva CJ, et al. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008;41(5):439-43.
88. Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(3):239-51.
89. Couppie P, Clyti E, Sainte-Marie D, Dedet J, Carme B, Pradinaud R. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a

patient with 425 lesions. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2004;71(5):558-60.

90. Calvopina M, Gomez EA, Uezato H, Kato H, Nonaka S, Hashiguchi Y. Atypical clinical variants in New World cutaneous leishmaniasis: disseminated, erysipeloid, and recidiva cutis due to *Leishmania (V.) panamensis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2005;73(2):281-4.

91. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186(12):1829-34.

92. Rosa MEA, Machado PRL. Disseminated Leishmaniasis: Clinical, immunological, and therapeutic aspects. *Drug Development Research*. 2011;72(6):437-41.

93. Carvalho EMD, Barral A, Costa JML, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta tropica*. 1994;56(4):315-25.

94. Hashiguchi Y, Gomez EL, Kato H, Martini LR, Velez LN, Uezato H. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Trop Med Health*. 2016;44:2.

95. Machado PR, Rosa MEA, Costa D, Mignac M, Silva JS, Schriefer A, et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011;105(8):438-44.

96. Vernal S, De Paula NA, Gomes CM, Roselino AM. Disseminated Leishmaniasis by *Leishmania viannia* Subgenus: A Series of 18 Cases in Southeastern Brazil. *Open forum infectious diseases*. 2016;3(1):ofv184.

97. Velez ID, Jimenez A, Vasquez D, Robledo SM. Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: Report of 27 Cases. *Case reports in dermatology*. 2015;7(3):275-86.

98. Dantas ML, Oliveira JMGCd, Carvalho L, Passos ST, Queiroz A, Guimarães LH, et al. Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014;109(2):202-9.

99. David C, Dimier-David L, Vargas F, Torrez M, Dedet J. Fifteen years of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia: a retrospective study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1993;87(1):7-9.

100. Tedesqui VL, Chuquimia Calleja GN, Parra R, Palacios Pabón J, Bóia MN, Carvalho-Costa FA. Active surveillance of American tegumentary leishmaniasis in endemic areas in rural Bolivia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012;45(1):30-4.
101. Gontijo C, Da Silva E, De Fuccio M, de Sousa M, Pacheco R, Dias E, et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta tropica*. 2002;81(2):143-50.
102. Bedoya-Pacheco SJ, Araujo-Melo MH, Valete-Rosalino CM, Pimentel MIF, Conceição-Silva F, Schubach AO, et al. Endemic tegumentary leishmaniasis in Brazil: correlation between level of endemicity and number of cases of mucosal disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;84(6):901-5.
103. Faucher B, Pomares C, Fourcade S, Benyamine A, Marty P, Pratloug L, et al. Mucosal *Leishmania infantum* leishmaniasis: specific pattern in a multicentre survey and historical cases. *Journal of Infection*. 2011;63(1):76-82.
104. Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado PRL, et al. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. 2007.
105. Herwaldt MBL. Leishmaniasis. *The Lancet*. 1999;354(9185):1191-9.
106. de Castro EA, Luz E, Telles FQ, Pandey A, Biseto A, Dinaiski M, et al. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Parana State, Brazil. *Acta tropica*. 2005;93(2):141-9.
107. Machado-Coelho GL, Caiaffa WT, Genaro O, Magalhaes PA, Mayrink W. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2005;99(1):55-61.
108. Lessa HA, Lessa MM, Guimaraes LH, Lima CM, Arruda S, Machado PR, et al. A proposed new clinical staging system for patients with mucosal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106(6):376-81.
109. Oliveira MRFd, Macêdo VdO, Carvalho EMd, Barral A, Marotti JG, Bittencourt A, et al. Estudo evolutivo da leishmaniose mucosa (7 a 17 anos de seguimento) causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em Três Braços, Bahia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1995;28(4):325-32.
110. da Costa DCS, Palmeiro MR, Moreira JS, da Costa Martins AC, da Silva AF, de Fátima Madeira M, et al. Oral manifestations in the American tegumentary leishmaniasis. *PloS one*. 2014;9(11):e109790.

111. Borges KT, Nogueira LSC, Sampaio JHD, Tauil PL, Sampaio RNR. Clinical, epidemiological and therapeutic study of 402 patients with american cutaneous leishmaniasis attended at University Hospital of Brasilia, DF, Brazil. *An Bras Dermatol*. 2005;80(3):249-54.
112. García Choque MA. Leishmaniasis con afectación de vía aérea inferior y superior, sin compromiso cutáneo. *Revista americana de medicina respiratoria*. 2015;15(3):241-6.
113. Tavares-Neto J, Costa JM, Marsden PD, Barreto AC, Cuba CC. Composição racial e a avaliação da reação intradérmica de Montenegro em portadores da leishmaniose cutâneo-mucosa. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1986;19(2):0-.
114. Gomes CM, de Paula NA, Cesetti MV, Roselino AM, Sampaio RN. Mucocutaneous leishmaniasis: accuracy and molecular validation of noninvasive procedures in a *L. (V.) braziliensis*-endemic area. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;79(4):413-8.
115. Castes M, Agnelli A, Verde O, Rondon A. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1983;27(2):176-86.
116. Nogueira MF, Goto H, Sotto MN, Cuce LC. Cytokine profile in Montenegro skin test of patients with localized cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008;50(6):333-7.
117. Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;53(3):273-7.
118. Silva D. Leishmaniose anérgica hansenóide. *An Bras Dermatol*. 1982;57(3):147-50.
119. LOPES COSTA J, GAMA M, KARININE CUNHA A, SALDANHA A. LEISHMANIOSE CUTANEA DIFUSA (LCD) NO BRASIL: REVISAO. *Anais brasileiros de dermatologia*. 1998;73(6):565-76.
120. Convit J, Kerdel-Vegas F, Gordon B. Disseminated anergic cutaneous leishmaniasis. *British Journal of Dermatology*. 1962;74(4):132-5.
121. Convit J, Lapenta P. Sobre un caso de leishmaniasis tegumentaria de forma diseminada. *Revista de la Policlínica, Caracas*. 1948;17:153-8.

122. Barral A, Costa JM, BITTENCOURT AL, BARRAL-NETTO M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *International journal of dermatology*. 1995;34(7):474-9.
123. Costa J. Modalidades clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana. Barral A, Costa JML Leishmanias ea Leishmaniose tegumentar nas Americas Salvador: CYTED, CNPq2011.
124. Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartz RA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. *J Am Acad Dermatol*. 2015;73(6):897-908; quiz 9-10.
125. Velasco O, Savarino SJ, Walton BC, Gam AA, Neva FA. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 1989;41(3):280-8.
126. Costa JM, Saldanha AC, Silva Cde M, Neto AS, Galvao CE, Godinho AM, et al. [Current status of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the State of Maranhao. I. Preliminary report]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1991;24(1):59-60.
127. Menezes JA, Reis V, Thonon S. Perfuração do septo nasal em leishmaniose "cútis difusa". *An Bras Derm*. 1978;53:199-200.
128. Saldanha AC, Malheiros TS, Rodrigues Cda C, Balby IT, Costa JM. [Bone alterations observed in diffuse cutaneous leishmaniasis in the State of Maranhao]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1995;28(1):55-6.
129. Silva D. Leishmaniose tegumentar queloidiana, com lesões ósseas. *An Bras Derm Sifil*. 1958;33:3-7.
130. Fonseca AdPMd, Fonseca WSMd. Leishmaniose tegumentar difusa: relato de um caso. *An bras dermatol*. 1986;61(3):145-9.
131. Costa AA, Saldanha AC, Leite BM, Ramos B, Junior IA, Noronha AL, et al. Imaging exams of bone lesions in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). *Acta Trop*. 2005;96(1):9-15.
132. Costa AA, Abreu AL, Gomes CM, Saldanha AC, Barral A, Costa JM, et al. Experimental model of chronic osteomyelitis caused by *Leishmania (L) amazonensis*. *Acta Trop*. 2006;98(2):125-9.
133. Salman SM, Rubeiz NG, Kibbi A-G. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. *Clinics in dermatology*. 1999;17(3):291-6.
134. Guenoun F, Doukan S, Bouree P, Vieillefond A, editors. Une éruption cutanée diffuse et persistante chez une immuno-déprimée. *Annales de pathologie*; 1990: Masson.

135. Banuls J, Boix V, Portilla J, Silvestre JF. Leishmaniasis as a cause of oral disease in HIV infection. *Aids*. 1995;9(1):96-8.
136. Hooja S, Sharma B, Jindal A, Vyas N. First reported cases of diffuse cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus positive patients in Jaipur District of Rajasthan, India. *Trop Parasitol*. 2014;4(1):50-2.
137. Moritomo A, Pontello R, Eisele R, Morimoto H, Bortoliero A. LTA difusa em paciente infectado pelo HIV: relato de caso. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 1998;73:219-22.
138. Calvopina M, Gomez EA, Sindermann H, Cooper PJ, Hashiguchi Y. Relapse of new world diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana* after miltefosine treatment. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;75(6):1074-7.
139. Furtado T. Immunology of american leishmaniasis. *International journal of dermatology*. 1973;12(2):88-94.
140. Wagener EH. A skin reaction to extracts of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum*. 1923;20(22):477-88.
141. Reed SG, Badaró R, Masur H, Carvalho EM, Lorencó R, Lisboa A, et al. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1986;35(1):79-85.
142. Momeni Boroujeni A, Aminjavaheri M, Moshtaghian B, Momeni A, Momeni AZ. Reevaluating leishmanin skin test as a marker for immunity against cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*. 2013;52(7):827-30.
143. ANVISA. Antígeno de montenegro Consultas- ANVISA2018 [Available from: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/25351034160200354/>].
144. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, de Jesus AR, Dutra WO, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and immunity*. 2002;70(12):6734-40.
145. Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa J, Reed S, et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. 1985;135(6):4144-8.
146. Muniz AC, Bacellar O, Lago EL, Carvalho AM, Carneiro PP, Guimaraes LH, et al. Immunologic Markers of Protection in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection: A 5-Year Cohort Study. *J Infect Dis*. 2016;214(4):570-6.

147. Alimohammadian MH, Jones SL, Darabi H, Riazirad F, Ajdary S, Shabani A, et al. Assessment of interferon- γ levels and leishmanin skin test results in persons recovered for leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012;87(1):70-5.
148. Schnorr D, Muniz AC, Passos S, Guimaraes LH, Lago EL, Bacellar O, et al. IFN-gamma production to leishmania antigen supplements the leishmania skin test in identifying exposure to *L. braziliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(12):e1947.
149. Guedes ACM, Cucé LC, Furtado T. Avaliação imunológica e histopatológica da reação de Montenegro. *An Bras Dermatol*. 1990;65(5a, supl):34S-40S.
150. Guarín N, Palma GI, Pirmez C, Valderrama L, Tovar R, Saravia NG. Comparative immunohistological analysis of the Montenegro skin test reaction in asymptomatic infection and in acute and chronic cutaneous leishmaniasis. *Biomedica*. 2006;26:38-48.
151. Tojal da Silva AC, Cupolillo E, Volpini ÂC, Almeida R, Sierra Romero GA. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Tropical Medicine & International Health*. 2006;11(9):1388-98.
152. Hashemi SN, Mohebbali M, Mansouri P, Bairami A, Hajjaran H, Akhoundi B, et al. Comparison of leishmanin skin test and direct smear for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Acta medica Iranica*. 2011;49(3):136-41.
153. Sadeghian G, Momeni A, Siadat AH, Yousefi P. Evaluation of leishmanin skin test and its relationship with the clinical form and duration of cutaneous leishmaniasis. *Dermatol Online J*. 2006;12(7):3.
154. Cuba Cuba C, Marsden PD, Barreto AC, Rocha R, Sampaio RR, Patzlaff L. Parasitologic and immunologic diagnosis of American (mucocutaneous) leishmaniasis. 1981.
155. Espir TT, Guerreiro TS, Naiff Mde F, Figueira Lde P, Soares FV, da Silva SS, et al. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. *Exp Parasitol*. 2016;167:1-6.
156. Manzur A. Sensitivity of leishmanin skin test in patients of acute cutaneous leishmaniasis. *Dermatology online journal*. 2006;12(4).
157. Boggild AK, Ramos AP, Espinosa D, Valencia BM, Veland N, Miranda-Verastegui C, et al. Clinical and demographic stratification of test performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2010;83(2):345-50.

158. Ivonise F, Cibele A, Olívia B, Clarissa BA, Lucas PC, Roque PA, et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;34(11):e54-e8.
159. Dostrovsky A, Sagher F. The intracutaneous test in cutaneous leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 1946;40(3-4):265-9.
160. Davies CR, Llanos-Cuentas E, Pyke S, Dye C. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. *Epidemiology & Infection*. 1995;114(2):297-318.
161. Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, et al. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102(5):625-30.
162. De Luca P, Mayrink W, Santiago M, Nogueira R, Conceição-Silva F, Melo G, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study on the immunogenicity of the leishmanin skin test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003;97(6):709-12.
163. Nascimento MD, Alcântara-Neves NM, Muniz MEB, Nunes SF, Paranhos M, de Carvalho LCP. Induction and modulation of the immune response to *Leishmania* by Montenegro's skin test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1993;87(1):91-3.
164. Furtado TA, Pellegrino J. Intradermal Test in American Leishmaniasis with a Polysaccharide Fraction Isolated from *Leishmania Brasilensis*¹. *Journal of Investigative Dermatology*. 1956;27(2):53-9.
165. Restrepo Isaza M. La reacción de Montenegro en la epidemiología de la leishmaniasis sudamericana. 1980.
166. de Castro LCM, Rotta O, Cucé LC. Intradermorreação de Montenegro em doentes com tuberculose. *An bras Dermatol*. 1980;55(2):79-80.
167. Smrkovski L, Larson C. Antigenic cross-reactivity between *Mycobacterium bovis* (BCG) and *Leishmania donovani*. *Infection and immunity*. 1977;18(2):561.
168. El-Safi SH, Hamid N, Omer A, Abdel-Haleem A, Hammad A, Kareem HG, et al. Infection rates with *Leishmania donovani* and *Mycobacterium tuberculosis* in a village in eastern Sudan. *Tropical Medicine & International Health*. 2004;9(12):1305-11.

169. Rab MA, Evans DA. The effect of BCG vaccination on the leishmanin skin test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994;88(5):541-2.
170. Minaya-Gómez G, Vargas-Apaza S, Monteza-Zuloeta Y, Purisaca-Morante E, Delgado-Díaz F. Especificidad de la prueba intradérmica de Montenegro en pacientes infectados por *Trypanosoma cruzi* procedentes de diferentes regiones del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2014;31(2):278-81.
171. de Lima Barros MB, Schubach A, Francesconi-do-Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach TMP, Conceição-Silva F, et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Acta tropica*. 2005;93(1):41-7.
172. Pineda JA, Macías J, Morillas F, Fernández-Ochoa J, Cara J, de la Rosa R, et al. False-positive results of leishmanin skin test due to phenol-containing diluent. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;95(2):173-4.
173. Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical reviews in microbiology*. 1995;21(2):123-52.
174. Pomares C, Despierres L, del Giudice P, Delaunay P, Michel G, Ferrua B, et al. Western blot analysis as an aid for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;106(7):452-4.
175. Mendonça SC, Souza WJ, Nunes MP, Marzochi MC, Coutinho SG. Indirect immunofluorescence test in new world Leishmaniasis: serological and clinical relation-ship. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1988;83(3):347-55.
176. Souza WJSd, Coutinho SG, Marzochi MCdA, Toledo LMD, Gottlieb MV. Utilização da reação de imunofluorescência indireta no acompanhamento da terapêutica da leishmaniose tegumentar americana'. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1982;77(3):247-53.
177. Casavechia MTG, Silveira TGV, Teodoro U, Janeiro V, Udo M, Campana Lonardoní MV. Variables associated with the post-treatment healing of lesions in patients with American cutaneous leishmaniasis in Paraná State, Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;45(4):841-7.
178. Szargiki R, Castro EAd, Luz E, Kowalthuk W, Machado ÂM, Thomaz-Soccol V. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2009;13(1):47-52.

179. Romero GAS, Orge MdIGO, de Farias Guerra MV, Paes MG, de Oliveira Macêdo V, de Carvalho EM. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta tropica*. 2005;93(1):49-56.
180. MARZOCHI MCdA, COUTINHO SG, SAIBROZA PC, de SOUZA WJS. REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCENCIA INDIRETA E INTEADERMOREEAÇÃO PARA LEISHMANIO SE TEGij MENTAR AMERICANA EM MORADORES NA AREA DE JACAREPAGUA (RIO DE JANEIRO). ESTUDO COMPARATIVO DOS. 1980.
181. Furtado T. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. *An Bras Dermatol*. 1980;55(2):81-6.
182. Luciano RM, Lucheis SB, Troncarelli MZ, Luciano DM, Langoni H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2009;46(3):181-7.
183. Cucé LC, OLIVEIRA FILHO J, FESTA N. C.-Intradermorreação de Montenegro e imunofluorescência indireta em familiares de doentes com leishmaniose tegumentar americana. *An bras Derm*. 1979;54:245-50.
184. Brito M, Mendonça M, Gomes Y, Jardim M, Abath F. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;95(2):203-6.
185. Llanos-Cuentas EA, Marsden PD, Lago EL, Barreto AC, Cuba CC, Johnson WD. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil: an area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. II. Cutaneous disease. Presentation and evolution. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1984;17(4):169-77.
186. Pereira VRA, Reis LdC, Souza MdA, de Oliveira AP, de Brito MEF, Lage PS, et al. Evaluation of anti-lived and anti-fixed *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012;74(3):292-8.
187. Yoneyama KA, de Peder LD, Lonardoni MV, Silveira TG. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay in patients from Northern Parana State, Brazil. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2007;11(3):360-4.
188. Hailu A. The use of direct agglutination test (DAT) in serological diagnosis of Ethiopian cutaneous leishmaniasis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2002;42(4):251-6.

189. Mengistu G, Laskay T, Gemetchu T, Humber D, Ersamo M, Evans D, et al. Cutaneous leishmaniasis in south-western Ethiopia: Ocholo revisited. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992;86(2):149-53.
190. Mengistu G, Kiessling R, Akuffo H. The value of a direct agglutination test in the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990;84(3):359-62.
191. Hosseinzadeh M, Omidifar N, Lohrasb MH. Use of fine needle aspiration cytology in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the conventional scraping method. *Tropical doctor.* 2012;42(2):112-3.
192. ul Bari A, Azam S, Ejaz A, Mahmood T. Comparison of various cytodagnostic tests in the rapid diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Pakistan Association of Dermatology.* 2016;20(2):63-9.
193. Ramirez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker DC, et al. The method used to sample ulcers influences the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2002;96(Supplement_1):S169-S71.
194. Sousa AQ, Pompeu MM, Frutuoso MS, Lima JW, Tinel JM, Pearson RD. Press imprint smear: a rapid, simple, and cheap method for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91(5):905-7.
195. Daneshbod Y, Oryan A, Davarmanesh M, Shirian S, Negahban S, Aledavood A, et al. Clinical, histopathologic, and cytologic diagnosis of mucosal leishmaniasis and literature review. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2011;135(4):478-82.
196. Andresen K, Gaafar A, El-Hassan A, Ismail A, Dafalla M, Theander T, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*: a comparison with direct microscopy of smears and sections from lesions. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1996;90(2):133-5.
197. Ramírez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *Journal of clinical microbiology.* 2000;38(10):3768-73.
198. Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, Arevalo J, Martinez-Medina D, Llanos-Cuentas A, et al. Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2008;79(6):847-52.

199. Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *The Journal of parasitology*. 1999;181-7.
200. Weigle KA, de Davalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NG, D'alessandro A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1987;36(3):489-96.
201. Silva JGLd, Silva TMd, Peloso EdF, Machado-Coelho GLL, Mayrink W, Ariosa MCF, et al. Comparison among three polymerase chain reaction assays on detection of DNA from *Leishmania* in biological samples from patients with American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012;45(2):257-9.
202. Miranda A, Saldaña A, González K, Paz H, Santamaría G, Samudio F, et al. Evaluation of PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis and species identification using filter paper samples in Panama, Central America. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;106(9):544-8.
203. Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, Presber W. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. *Acta Tropica*. 2006;99(1):55-61.
204. Laskay T, Mikó TL, Negesse Y, Solbach W, Röllinghoff M, Frommel D. Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995;89(3):273-5.
205. Yehia L, Adib-Houreih M, Raslan WF, Kibbi AG, Loya A, Firooz A, et al. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species identification: analysis of 122 biopsies with varied parasite index. *Journal of cutaneous pathology*. 2012;39(3):347-55.
206. Gomes CM, Mazin SC, Santos ERd, Cesetti MV, Bächtold GAB, Cordeiro JHdF, et al. Accuracy of mucocutaneous leishmaniasis diagnosis using polymerase chain reaction: systematic literature review and meta-analysis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110(2):157-65.
207. van der Meide WF, Schoone GJ, Faber WR, Zeegelaar JE, de Vries HJ, Özbel Y, et al. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(11):5560-6.
208. van der Meide WF, Peekel I, van Thiel PP, Schallig HD, de Vries HJ, Zeegelaar JE, et al. Treatment assessment by monitoring parasite load in skin

biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis, using quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *Clin Exp Dermatol*. 2008;33(4):394-9.

209. de Magalhães AV, Moraes MA, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JM, Cuba CC, et al. Histopathology of Mucocutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis*: 4. A histopathological classification. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1986;28(6):421-30.

210. Venkataram M, Moosa M, Devi L. Histopathological spectrum in cutaneous leishmaniasis: A study in Oman. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*. 2001;67(6):294.

211. Sanguenza OP, Sanguenza JM, Stiller MJ, Sanguenza P. Mucocutaneous leishmaniasis: a clinicopathologic classification. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1993;28(6):927-32.

212. Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartz RA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *J Am Acad Dermatol*. 2015;73(6):911-26; 27-8.

213. Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Clinics in dermatology*. 1999;17(3):297-304.

214. Choi CM, Lerner EA. Leishmaniasis: recognition and management with a focus on the immunocompromised patient. *Am J Clin Dermatol*. 2002;3(2):91-105.

215. Ridley D, Marsden P, Cuba C, Barreto A. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1980;74(4):508-14.

216. Ridley D. A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1980;74(4):515-21.

217. Ridley D, Ridley MJ. The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. *The Journal of pathology*. 1983;141(1):83-96.

218. el Hassan AM, Kadaru AM, Khalil EA, Fadl A, el Hassan MM. The pathology of cutaneous leishmaniasis in the Sudan: a comparison with that in other geographical areas. *Ann Trop Med Parasitol*. 1996;90(5):485-90.

219. Convit J, Pinaridi ME, Rondon AJ. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1972;66(4):603-10.

220. Brito A. Aspectos histopatológicos da leishmaniose tegumentar americana. *An bras Derm.* 1982;57:145-6.
221. Bittencourt AL. Aspectos histopatológicos e ultra-estruturais da leishmaniose cutânea difusa (LCD). *Gazeta Médica da Bahia.* 2009;79((Supl.3)):45-51.
222. Marsden P, Nonata R. Mucocutaneous leishmaniasis: a review of clinical aspects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 1975;9(6):309-26.
223. Moraes MA, Silveira FT. [Histopathology of the localized form of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1994;36(5):459-63.
224. Liew FY. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nature reviews Immunology.* 2002;2(1):55-60.
225. Parish C, Liew F. Immune response to chemically modified flagellin: III. Enhanced cell-mediated immunity during high and low zone antibody tolerance to flagellin. *Journal of Experimental Medicine.* 1972;135(2):298-311.
226. Liew F, Parish C. Lack of a correlation between cell-mediated immunity to the carrier and the carrier-hapten helper effect. *Journal of Experimental Medicine.* 1974;139(3):779-84.
227. Tada T, Takemori T, Okumura K, Nonaka M, Tokuhisa T. Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells. *Journal of Experimental Medicine.* 1978;147(2):446-58.
228. Reed SG, Scott P. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Current opinion in immunology.* 1993;5(4):524-31.
229. Miralles GD, Stoeckle M, McDermott D, Finkelman F, Murray H. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity.* 1994;62(3):1058-63.
230. Caceres-Dittmar G, Tapia F, Sánchez M, Yamamura M, Uyemura K, Modlin R, et al. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clinical & Experimental Immunology.* 1993;91(3):500-5.
231. Ehrlich AK, Fernández OL, Rodriguez-Pinto D, Castilho TM, Caridad MJC, Goldsmith-Pestana K, et al. Local delivery of the Toll-like receptor 9 ligand CpG downregulates host immune and inflammatory responses, ameliorating established *Leishmania (Viannia) panamensis* chronic infection. *Infection and immunity.* 2017;85(3):e00981-16.

232. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91(4):1390-5.
233. Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2002;9(2):251-6.
234. Amato VS, de Andrade Jr HF, Duarte MIS. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta tropica*. 2003;85(1):39-49.
235. Amato VS, Andrade Jr HF, Neto VA, Duarte MIS. Persistence of tumor necrosis factor- α in situ after lesion healing in mucosal leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003;68(5):527-8.
236. Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001;65(2):87-9.
237. Leopoldo PT, Machado PR, Almeida RP, Schriefer A, Giudice A, de Jesus AR, et al. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC infectious diseases*. 2006;6(1):75.
238. Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, et al. Leishmania RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*. 2011;331(6018):775-8.
239. Ronet C, Beverley SM, Fasel N. Muco-cutaneous leishmaniasis in the New World: the ultimate subversion. *Virulence*. 2011;2(6):547-52.
240. Rossi M, Castiglioni P, Hartley M-A, Eren RO, Prével F, Desponds C, et al. Type I interferons induced by endogenous or exogenous viral infections promote metastasis and relapse of leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017:201621447.
241. Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(6).
242. Bretscher P, Cohn M. A Theory of Self-Nonsel Self Discrimination: Paralysis and induction involve the recognition of one and two determinants on an antigen, respectively. *Science*. 1970;169(3950):1042-9.

243. Bretscher PA. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(1):185-90.
244. Mueller D, Jenkins M, Schwartz R. Costimulatory interactions determine proliferation versus induction of clonal anergy during type I CD4+ T-cell stimulation. *Progress in Immunology*: Springer; 1989. p. 572-80.
245. Alegre M-L, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nature Reviews Immunology*. 2001;1(3):220-8.
246. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 1995;3(5):541-7.
247. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science*. 1995;270(5238):985-8.
248. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11(2):141-51.
249. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*. 2001;291(5502):319-22.
250. Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Bluestone JA, Miller SD. Targeting the B7/CD28: CTLA-4 costimulatory system in CNS autoimmune disease. *Journal of neuroimmunology*. 1998;89(1-2):10-8.
251. Sansom D. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology*. 2000;101(2):169-77.
252. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2(2):116-26.
253. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal*. 1992;11(11):3887-95.
254. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubat T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International immunology*. 1996;8(5):765-72.

255. Wang J, Okazaki I-m, Yoshida T, Chikuma S, Kato Y, Nakaki F, et al. PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice. *International immunology*. 2010;22(6):443-52.
256. Wang J, Yoshida T, Nakaki F, Hiai H, Okazaki T, Honjo T. Establishment of NOD-Pdcd1^{-/-} mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(33):11823-8.
257. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature medicine*. 1999;5(12):1365.
258. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology*. 2001;2(3):261.
259. Freeman GJ, Wherry EJ, Ahmed R, Sharpe AH. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1–PD-1 ligand blockade. *Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(10):2223-7.
260. Ansari MJ, Salama AD, Chitnis T, Smith RN, Yagita H, Akiba H, et al. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med*. 2003;198(1):63-9.
261. Martin-Orozco N, Wang YH, Yagita H, Dong C. Cutting Edge: Programmed death (PD) ligand-1/PD-1 interaction is required for CD8⁺ T cell tolerance to tissue antigens. *J Immunol*. 2006;177(12):8291-5.
262. Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nature genetics*. 2002;32(4):666-9.
263. Latchman YE, Liang SC, Wu Y, Chernova T, Sobel RA, Klemm M, et al. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(29):10691-6.
264. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12293-7.
265. Hori J, Wang M, Miyashita M, Tanemoto K, Takahashi H, Takemori T, et al. B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. *The Journal of Immunology*. 2006;177(9):5928-35.

266. Watson MP, George AJ, Larkin DF. Differential effects of costimulatory pathway modulation on corneal allograft survival. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006;47(8):3417-22.
267. Trautmann L, Mbitikon-Kobo F-M, Goulet J-P, Peretz Y, Shi Y, Van Grevenynghe J, et al. Profound metabolic, functional and cytolytic differences characterize HIV-specific CD8 T cells in primary and chronic HIV infection. *Blood*. 2012;blood-2012-04-422550.
268. Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, et al. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol*. 2006;80(22):11398-403.
269. Watanabe T, Bertoletti A, Tanoto T. PD-1/PD-L1 pathway and T-cell exhaustion in chronic hepatitis virus infection. *Journal of viral hepatitis*. 2010;17(7):453-8.
270. Butler NS, Moebius J, Pewe LL, Traore B, Doumbo OK, Tygrett LT, et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium* infection. *Nature immunology*. 2012;13(2):188-95.
271. Joshi T, Rodriguez S, Perovic V, Cockburn IA, Stäger S. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8+ T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. *PLoS pathogens*. 2009;5(5):e1000431.
272. Shinkai Y, Lam K-P, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V (D) J rearrangement. *Cell*. 1992;68(5):855-67.
273. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8(8):793-800.
274. Thompson RH, Gillett MD, Chevillie JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(49):17174-9.
275. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(8):2947-53.
276. Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang XG, Xu N. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta histochemica*. 2006;108(1):19-24.

277. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(9):3360-5.
278. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2007;56(8):1173-82.
279. Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(7):2151-7.
280. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*. 2010;116(7):1757-66.
281. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*. 2015;372(4):320-30.
282. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2521-32.
283. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;373(1):23-34.
284. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crino L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(2):123-35.
285. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(26):2443-54.
286. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2015;373(19):1803-13.
287. Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, Redman BG, Kuzel TM, Harrison MR, et al. Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial. *J Clin Oncol*. 2015;33(13):1430-7.

288. Armand P, Shipp MA, Ribrag V, Michot JM, Zinzani PL, Kuruville J, et al. Programmed Death-1 Blockade With Pembrolizumab in Patients With Classical Hodgkin Lymphoma After Brentuximab Vedotin Failure. *J Clin Oncol*. 2016;34(31):3733-9.
289. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Van Der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *Journal of virology*. 2003;77(8):4911-27.
290. Blazar BR, Carreno BM, Panoskaltsis-Mortari A, Carter L, Iwai Y, Yagita H, et al. Blockade of programmed death-1 engagement accelerates graft-versus-host disease lethality by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol*. 2003;171(3):1272-7.
291. Özkaynak E, Wang L, Goodearl A, McDonald K, Qin S, O'Keefe T, et al. Programmed death-1 targeting can promote allograft survival. *The Journal of Immunology*. 2002;169(11):6546-53.
292. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006;443(7109):350.
293. Wykes MN, Horne-Debets JM, Leow C-Y, Karunaratne DS. Malaria drives T cells to exhaustion. *Frontiers in microbiology*. 2014;5.
294. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nature immunology*. 2011;12(6):492-9.
295. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature immunology*. 2009;10(1):29.
296. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(8):486-99.
297. Mou Z, Muleme HM, Liu D, Jia P, Okwor IB, Kuriakose SM, et al. Parasite-Derived Arginase Influences Secondary Anti-Leishmania Immunity by Regulating Programmed Cell Death-1–Mediated CD4+ T Cell Exhaustion. *The Journal of Immunology*. 2013;190(7):3380-9.
298. Salazar MM, Domínguez JD, Estrada JS, Bonilla CG, Becker I. Vaccination with *Leishmania mexicana* LPG induces PD-1 in CD8+ and PD-L2 in macrophages thereby suppressing the immune response: a model to assess vaccine efficacy. *Vaccine*. 2014;32(11):1259-65.
299. Egui A, Ledesma D, Pérez-Antón E, Montoya A, Gómez I, Robledo SM, et al. Phenotypic and Functional Profiles of Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells

Associated with Infection Control in Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018;8.

300. Bittencourt AL, Rodrigues de Freitas LA. [Diffuse cutaneous leishmaniasis. Anatomic-pathologic aspects]. *Med Cutan Ibero Lat Am*. 1983;11(4):265-70.

301. Cavelier B, Bertail MA, Chemaly P, Bonvalet D, Civatte J. [Post-kala-azar dermal leishmaniasis or diffuse cutaneous leishmaniasis]. *Annales de dermatologie et de venerologie*. 1984;111(6-7):579-86.

302. Convit J, Ulrich M. Antigen-specific immunodeficiency and its relation to the spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Biol Res*. 1993;26(1-2):159-66.

303. Da Fonseca Ade P, Araujo Rda C, Da Fonseca WS. [Diffuse cutaneous leishmaniasis]. *Med Cutan Ibero Lat Am*. 1981;9(5):317-22.

304. Morsy TA, Romia SA, al-Ganayni GA, Abu-Zakham AA, al-Shazly AM, Rezk RA. Histocompatibility (HLA) antigens in Egyptians with two parasitic skin diseases (scabies and leishmaniasis). *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 1990;20(2):565-72.

305. Schurr E, Wunderlich F, Tadesse G. Electron microscopical studies on cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. II. Parasite and host cell differences between the localized and the diffuse form. *Acta Trop*. 1987;44(4):395-407.

306. Schurr E, Kidane K, Yemaneberhan T, Wunderlich F. Cutaneous leishmaniasis in Ethiopia: I. Lymphocyte transformation and antibody titre. *Tropical medicine and parasitology : official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)*. 1986;37(4):403-8.

307. Veress B, el Hassan AM, Kutty MK, Al-Gindan Y, Kubba R, Omer AE. Immunohistological investigations in chronic cutaneous leishmaniasis in Saudi Arabia. *Tropical and geographical medicine*. 1986;38(4):380-5.

308. Wermert D, Lamblin C, Wallaert B, Marty P, Leroy C. Pulmonary sarcoidosis with cutaneous leishmaniasis. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG*. 1999;16(2):228-9.

309. Campos MB, Lima LVdR, de Lima ACS, Vasconcelos dos Santos T, Ramos PKS, Gomes CMdC, et al. Toll-like receptors 2, 4, and 9 expressions over the entire clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis*. *PLOS ONE*. 2018;13(3):e0194383.

310. Malta-Santos H, Andrade BB, Zanette DL, Costa JM, Bozza PT, Bandeira-Melo C, et al. Resolvin D1 drives establishment of *Leishmania amazonensis* infection. *Sci Rep.* 2017;7:46363.
311. Franca-Costa J, Van Weyenbergh J, Boaventura VS, Luz NF, Malta-Santos H, Oliveira MC, et al. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2015;211(3):426-35.
312. Fernandez-Figueroa EA, Imaz-Rosshandler I, Castillo-Fernandez JE, Miranda-Ortiz H, Fernandez-Lopez JC, Becker I, et al. Down-Regulation of TLR and JAK/STAT Pathway Genes Is Associated with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis: A Gene Expression Analysis in NK Cells from Patients Infected with *Leishmania mexicana*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(3):e0004570.
313. Caneda-Guzman IC, Salaiza-Suazo N, Fernandez-Figueroa EA, Carrada-Figueroa G, Aguirre-Garcia M, Becker I. NK cell activity differs between patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis infected with *Leishmania mexicana*: a comparative study of TLRs and cytokines. *PLoS One.* 2014;9(11):e112410.
314. Khouri R, Santos GS, Soares G, Costa JM, Barral A, Barral-Netto M, et al. SOD1 plasma level as a biomarker for therapeutic failure in cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2014;210(2):306-10.
315. Diaz NL, Zerpa O, Tapia FJ. Chemokines and chemokine receptors expression in the lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(4):446-52.
316. Buxbaum LU. *Leishmania mexicana* infection induces IgG to parasite surface glycoinositol phospholipids that can induce IL-10 in mice and humans. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(5):e2224.
317. Fernandez-Figueroa EA, Rangel-Escareno C, Espinosa-Mateos V, Carrillo-Sanchez K, Salaiza-Suazo N, Carrada-Figueroa G, et al. Disease severity in patients infected with *Leishmania mexicana* relates to IL-1beta. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(5):e1533.
318. Vivarini Ade C, Pereira Rde M, Teixeira KL, Calegari-Silva TC, Bellio M, Laurenti MD, et al. Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2011;25(12):4162-73.
319. Hernández-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y, et al. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(11):e871.

320. Campanelli AP, Brodskyn CI, Boaventura V, Silva C, Roselino AM, Costa J, et al. Chemokines and chemokine receptors coordinate the inflammatory immune response in human cutaneous leishmaniasis. *Hum Immunol.* 2010;71(12):1220-7.
321. Carneiro F, De Magalhaes A, De Jesus Abreu Almeida Couto M, Bocca A, MUNIZ-JUNQUEIRA M, Ribeiro Sampaio R. Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasite immunology.* 2009;31(10):646-51.
322. Pereira LI, Dorta ML, Pereira AJ, Bastos RP, Oliveira MA, Pinto SA, et al. Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/Leishmania antigens. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(3):378-83.
323. Fernandez-Mestre M, Sanchez K, Balbas O, Gendzekhzadze K, Ogando V, Cabrera M, et al. Influence of CTLA-4 gene polymorphism in autoimmune and infectious diseases. *Hum Immunol.* 2009;70(7):532-5.
324. Azeredo-Coutinho RB, Conceicao-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101(7):735-7.
325. Galindo-Sevilla N, Soto N, Mancilla J, Cerbulo A, Zambrano E, Chavira R, et al. Low serum levels of dehydroepiandrosterone and cortisol in human diffuse cutaneous leishmaniasis by *Leishmania mexicana*. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(3):566-72.
326. Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2007;29(12):671-8.
327. Carrada G, Caneda C, Salaiza N, Delgado J, Ruiz A, Sanchez B, et al. Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol.* 2007;29(3):117-26.
328. Diaz NL, Arvelaez FA, Zerpa O, Tapia FJ. Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol.* 2006;31(1):114-7.
329. Xavier MB, Silveira FT, Demachki S, Ferreira MMR, do Nascimento JLM. American tegumentary leishmaniasis: a quantitative analysis of Langerhans cells presents important differences between *L.(L.) amazonensis* and *Viannia* subgenus. *Acta tropica.* 2005;95(1):67-73.
330. Convit J, Ulrich M, Polegre MA, Avila A, Rodríguez N, Mazzedo MI, et al. Therapy of Venezuelan patients with severe mucocutaneous or early lesions of

diffuse cutaneous leishmaniasis with a vaccine containing pasteurized *Leishmania* promastigotes and bacillus Calmette-Guerin: preliminary report. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(1):57-62.

331. Cabrera M, Rodriguez Od, Monsalve I, Tovar R, Hagel I. Variations in the serum levels of soluble CD23, nitric oxide and IgE across the spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Acta tropica*. 2003;88(2):145-51.

332. Diaz NL, Zerpa O, Ponce LV, Convit J, Rondon AJ, Tapia FJ. Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterisation of the lesion. *Exp Dermatol*. 2002;11(1):34-41.

333. Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Rollinghoff M, Bogdan C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 2002;70(8):4638-42.

334. Salaiza-Suazo N, Volkow P, Tamayo R, Moll H, Gillitzer R, Pérez-Torres A, et al. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Tropical Medicine & International Health*. 1999;4(12):801-11.

335. Silveira FT, Blackwell JM, Ishikawa EA, Braga R, Shaw JJ, Quinnell RJ, et al. T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. *Parasite Immunol*. 1998;20(1):19-26.

336. Osland A, Ashenafi S, Vefring HK, Michaelsen TE. Crossreactions and sequence homologies between recombinant polypeptides from *Leishmania aethiopia* and human IgG and IgM. *FEMS immunology and medical microbiology*. 1997;17(1):11-9.

337. Akuffo H, Maasho K, Bløstødt M, Hojeberg B, Britton S, Bakhiat M. *Leishmania aethiopia* derived from diffuse leishmaniasis patients preferentially induce mRNA for interleukin-10 while those from localized leishmaniasis patients induce interferon-gamma. *J Infect Dis*. 1997;175(3):737-41.

338. Weinstock C, Knobloch J, Schultheis W, Northoff H. Impaired production of cytokines in a case of human leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 1997;25(6):1334-9.

339. Skeiky YA, Benson DR, Costa JL, Badaro R, Reed SG. Association of *Leishmania* heat shock protein 83 antigen and immunoglobulin G4 antibody titers in Brazilian patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 1997;65(12):5368-70.

340. Ritter U, Moll H, Laskay T, Bröcker E-B, Velazco O, Becker I, et al. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*. 1996;173(3):699-709.
341. Rodriguez V, Centeno M, Ulrich M. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. *Parasite Immunol*. 1996;18(7):341-5.
342. Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 1996;84(2):188-94.
343. Ulrich M, Rodriguez V, Centeno M, Convit J. Differing antibody IgG isotypes in the polar forms of leprosy and cutaneous leishmaniasis characterized by antigen-specific T cell anergy. *Clin Exp Immunol*. 1995;100(1):54-8.
344. Teklemariam S, Hiwot AG, Frommel D, Miko TL, Ganlov G, Bryceson A. Aminosidine and its combination with sodium stibogluconate in the treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania aethiopica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994;88(3):334-9.
345. Akuffo H, Maasho K. High serum-soluble interleukin-2 receptor is not associated with the immunosuppression in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Scand J Immunol*. 1994;39(5):505-11.
346. Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Sanchez MA, Fernandez CT, Rondon AJ, Convit J. Adhesion molecules in lesions of American cutaneous leishmaniasis. *Exp Dermatol*. 1994;3(1):17-22.
347. Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Sanchez MA, Fernandez AE, Convit J. The cutaneous lesion in American leishmaniasis: leukocyte subsets, cellular interaction and cytokine production. *Biol Res*. 1993;26(1-2):239-47.
348. Caceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sanchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, et al. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol*. 1993;91(3):500-5.
349. el-Mogy MH, Abdel-Hamid IA, Abdel-Razic MM, Rizk RA, Romia SA. Histocompatibility antigens in Egyptians with cutaneous leishmaniasis: a preliminary study. *Journal of dermatological science*. 1993;5(2):89-91.
350. Akuffo HO. Non-parasite-specific cytokine responses may influence disease outcome following infection. *Immunol Rev*. 1992;127:51-68.
351. Martinez-Arends A, Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Mosca W, Valecillos L, Convit J. Immunocytochemical characterization of immune cells in lesions of

- American cutaneous leishmaniasis using novel T cell markers. *Acta Trop.* 1991;49(4):271-80.
352. Pisa P, Gennene M, Soder O, Ottenhoff T, Hansson M, Kiessling R. Serum tumor necrosis factor levels and disease dissemination in leprosy and leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1990;161(5):988-91.
353. Avila JL, Rojas M. A galactosyl(alpha 1-3)mannose epitope on phospholipids of *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* is recognized by trypanosomatid-infected human sera. *J Clin Microbiol.* 1990;28(7):1530-7.
354. Mengistu G, Akuffo H, Yemane-Berhan T, Britton S, Fehniger T. Serum antibody specificities to *Leishmania aethiopica* antigens in patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology.* 1990;12(4-5):495-507.
355. Melby PC, Kreutzer RD, McMahon-Pratt D, Gam AA, Neva FA. Cutaneous leishmaniasis: review of 59 cases seen at the National Institutes of Health. *Clin Infect Dis.* 1992;15(6):924-37.
356. Akuffo HO, Fehniger TE, Britton S. Differential recognition of *Leishmania aethiopica* antigens by lymphocytes from patients with local and diffuse cutaneous leishmaniasis. Evidence for antigen-induced immune suppression. *J Immunol.* 1988;141(7):2461-6.
357. Castes M, Cabrera M, Trujillo D, Convit J. T-cell subpopulations, expression of interleukin-2 receptor, and production of interleukin-2 and gamma interferon in human American cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 1988;26(6):1207-13.
358. Akuffo H, Schurr E, Andersson G, Yamaneberhan T, Britton S. Responsiveness in diffuse versus local cutaneous leishmaniasis is due to parasite differences. *Scandinavian journal of immunology.* 1987;26(6):717-21.
359. Castes M, Trujillo D, Scott D, Rondon AJ. Demonstration of an indomethacin-sensitive mechanism regulating immune reactivity in American cutaneous leishmaniasis patients. *Clin Exp Immunol.* 1987;69(2):280-90.
360. Nilsen R, Mshana RN. In situ characterization of the cutaneous immune response in Ethiopian cutaneous leishmaniasis. *Scand J Immunol.* 1987;26(5):503-12.
361. Rada E, Trujillo D, Castellanos PL, Convit J. Gamma interferon production induced by antigens in patients with leprosy and American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;37(3):520-4.

362. Modlin RL, Tapia FJ, Bloom BR, Gallinoto ME, Castes M, Rondon AJ, et al. In situ characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1985;60(2):241-8.
363. Petersen EA, Neva FA, Barral A, Correa-Coronas R, Bogaert-Diaz H, Martinez D, et al. Monocyte suppression of antigen-specific lymphocyte responses in diffuse cutaneous leishmaniasis patients from the Dominican Republic. *J Immunol.* 1984;132(5):2603-6.
364. Castes M, Agnelli A, Rondon AJ. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1984;57(2):279-86.
365. Petersen EA, Neva FA, Oster CN, Bogaert Diaz H. Specific inhibition of lymphocyte-proliferation responses by adherent suppressor cells in diffuse cutaneous leishmaniasis. *N Engl J Med.* 1982;306(7):387-92.
366. Bryceson AD. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. 3. Immunological studies. IV. Pathogenesis of diffuse cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1970;64(3):380-93.
367. SILVEIRA F, BLACKWELL J, ISHIKAWA E, BRAGA R, SHAW J, QUINNELL R, et al. T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the Lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. *Parasite Immunology.* 1998;20:19-26.
368. Melby PC, Neva FA, Sacks DL. Profile of human T cell response to leishmanial antigens. Analysis by immunoblotting. *J Clin Invest.* 1989;83(6):1868-75.
369. Bryceson A. Diffuse cutaneous leishmaniasis in ethiopia, III, IV. III Immunological studies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1970;64(3):380-93.
370. Cohen HA. Induction of delayed-type sensitivity to *Leishmania* parasite in a case of leishmaniasis cutanea diffusa with BCG and cord-factor (Trehalose-6-6' dimycolate). *Acta Derm Venereol.* 1979;59(6):547-9.
371. Convit J, Ulrich M, Fernandez C, Tapia F, Cáceres-Dittmar G, Castés M, et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1993;87(4):444-8.
372. Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T, Casali P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nature Reviews Immunology.* 2012;12:517.

373. Salmi M, Jalkanen S. Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5:760.
374. Palomino DCT, Marti LC. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*. 2015;13(3):469-73.
375. Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M. Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003;111(6):1185-99.
376. Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *European Journal of Immunology*. 2017;47(6):946-53.
377. Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature*. 1997;389:978.
378. Ruiz J, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology*. 2007;29(12):671-8.
379. Campos TM, Costa R, Passos S, Carvalho LP. Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2017;112(11):733-40.
380. Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araújo C, Carvalho EM. Evidence of in situ cytotoxicity in american cutaneous leishmaniasis. *European journal of dermatology: EJD*. 2002;12(5):449-51.
381. Lim K-H, Staudt LM. Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(1):a011247.
382. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annual review of immunology*. 2015;33:257-90.
383. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656-61.
384. Carneiro PP, Conceição J, Macedo M, Magalhães V, Carvalho EM, Bacellar O. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. *PloS one*. 2016;11(2):e0148084.
385. Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int J Dermatol*. 1995;34(7):474-9.

386. Convit J, Ulrich M, Polegre MA, Avila A, Rodriguez N, Mazzedo MI, et al. Therapy of Venezuelan patients with severe mucocutaneous or early lesions of diffuse cutaneous leishmaniasis with a vaccine containing pasteurized *Leishmania* promastigotes and bacillus Calmette-Guerin: preliminary report. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(1):57-62.
387. Cabrera M, Rodriguez O, Monsalve I, Tovar R, Hagel I. Variations in the serum levels of soluble CD23, nitric oxide and IgE across the spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*. 2003;88(2):145-51.
388. Mengistu G, Akuffo H, Fehniger TE. Immunoblot analysis of sera from Ethiopian cutaneous leishmaniasis by antibody class. *Scandinavian journal of immunology Supplement*. 1992;11:149-52.
389. Ritter U, Moll H, Laskay T, Brocker E, Velazco O, Becker I, et al. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1996;173(3):699-709.
390. Hernandez-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y, et al. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11):e871.
391. Carneiro FP, De Magalhaes AV, De Jesus Abreu Almeida Couto M, Bocca AL, Muniz-Junqueira MI, Ribeiro Sampaio RN. Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2009;31(10):646-51.
392. Silva CAM, Belisle JT. Host Lipid Mediators in Leprosy: The Hypothesized Contributions to Pathogenesis. *Frontiers in Immunology*. 2018;9(134).
393. Russell CD, Schwarze J. The role of pro-resolution lipid mediators in infectious disease. *Immunology*. 2014;141(2):166-73.
394. Lucas S. The Pharmacology of Indomethacin. *Headache*. 2016;56(2):436-46.
395. <DER83 Convit 2004 Vacina leishmaniose difusa.pdf>.
396. Berzunza-Cruz M, Bricaire G, Suazo NS, Pérez-Montfort R, Becker I. PCR for identification of species causing American cutaneous leishmaniasis. *Parasitology research*. 2009;104(3):691.
397. Bilbao-Ramos P, Dea-Ayuela MA, Cardenas-Alegría O, Salamanca E, Santalla-Vargas JA, Benito C, et al. Leishmaniasis in the major endemic region of Plurinational State of Bolivia: Species identification, phylogeography and drug susceptibility implications. *Acta tropica*. 2017;176:150-61.

398. Ji J, Sun J, Qi H, Soong L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002;66(4):338-45.
399. Vaish M, Singh OP, Chakravarty J, Sundar S. rK39 antigen for the diagnosis of visceral leishmaniasis by using human saliva. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012;86(4):598-600.
400. de Magalhães AV, Moraes MA, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JM, Cuba CC, et al. Histopathology of mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis brasiliensis*. 3. Cellular reaction. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1986;28(5):300-11.
401. Gomes C, Cesetti M, Morais O, Mendes M, Roselino A, Sampaio R. The influence of treatment on the development of leishmaniasis recidiva cutis: a 17-year case-control study in Midwestern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(1):109-14.
402. Oliveira-Neto MP, Mattos M, da Silva C, de Souza F, Fernandes O, Pirmez C. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. *International journal of dermatology*. 1998;37(11):846-9.
403. Calvopina M, Gomez EA, Sindermann H, Cooper PJ, Hashiguchi Y. Relapse of new world diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana* after miltefosine treatment. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75(6):1074-7.
404. Zerpa O, Ulrich M, Blanco B, Polegre M, Avila A, Matos N, et al. Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *Br J Dermatol*. 2007;156(6):1328-35.
405. da Silva Santos C, Brodskyn CI. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in public health*. 2014;2.
406. Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2007;51(2):229-42.
407. Carneiro MBH, Lopes MEdM, Vaz LG, Sousa LMA, dos Santos LM, de Souza CC, et al. IFN- γ -Dependent Recruitment of CD4+ T Cells and Macrophages Contributes to Pathogenesis During *Leishmania amazonensis* Infection. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2015;35(12):935-47.
408. Afonso L, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and immunity*. 1993;61(7):2952-9.

409. Jones DE, Buxbaum LU, Scott P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *The Journal of Immunology*. 2000;165(1):364-72.
410. Peters N, Sacks D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunological reviews*. 2006;213(1):159-79.
411. Xin L, Li Y, Soong L. Role of interleukin-1 β in activating the CD11c^{high} CD45RB⁻ dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4⁺ T cells in vitro and in vivo. *Infection and immunity*. 2007;75(10):5018-26.
412. Favali C, Tavares N, Clarencio J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn C. *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2007;82(6):1401-6.
413. Xin L, Wanderley J, Wang Y, VARGAS-INCHAUSTEGUI D, Soong L. The magnitude of CD4⁺ T-cell activation rather than TCR diversity determines the outcome of *Leishmania* infection in mice. *Parasite immunology*. 2011;33(3):170-80.
414. Macedo AB, Sánchez-Arcila JC, Schubach AdO, Mendonça S, Marins-Dos-Santos A, de Fatima Madeira M, et al. Multifunctional CD4⁺ T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clinical & Experimental Immunology*. 2012;167(3):505-13.
415. Carvalho A, Carvalho K, Passero L, Sousa M, da Matta V, Gomes C, et al. Differential recruitment of dendritic cells subsets to lymph nodes correlates with a protective or permissive T-cell response during *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Mediators of inflammation*. 2016;2016.
416. Kenney RT, Sacks DL, Sypek JP, Vilela L, Gam AA, Evans-Davis K. Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. 1999;163(8):4481-8.
417. Mendonca SC, De Luca PM, Mayrink W, Restom TG, Conceicao-Silva F, Da-Cruz AM, et al. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1995;53(2):195-201.
418. Qi H, Ji J, Wanasen N, Soong L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infection and immunity*. 2004;72(2):988-95.

419. Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L. CD4+ CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *The Journal of Immunology*. 2005;174(11):7147-53.
420. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RPd, Lessa H, Bacellar O, Carvalho E. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian journal of medical and biological research*. 1998;31(1):143-8.
421. Coêlho ZCB, Teixeira MJ, Mota EF, Frutuoso MS, da Silva JS, Barral A, et al. In vitro initial immune response against *Leishmania amazonensis* infection is characterized by an increased production of IL-10 and IL-13. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2010;14(5):476-82.
422. Pinheiro RO, Rossi-Bergmann B. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102(1):79-82.
423. Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, De Luca PM, Mendonça SC, Bertho AL, et al. T-Cell Responsiveness of American Cutaneous Leishmaniasis Patients to Purified *Leishmania pifanoi* Amastigote Antigens and *Leishmania braziliensis* Promastigote Antigens: Immunologic Patterns Associated with Cure. *Experimental parasitology*. 1996;84(2):144-55.
424. de Assis Souza M, de Castro MCB, de Oliveira AP, de Almeida AF, de Almeida TM, Reis LC, et al. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. *Microbial pathogenesis*. 2013;57:27-32.
425. Novais FO, Scott P, editors. CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. *Seminars in immunopathology*; 2015: Springer.
426. Bousoffara T, Louzir H, Salah AB, Dellagi K. Analysis of granzyme B activity as a surrogate marker of *Leishmania*-specific cell-mediated cytotoxicity in zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*. 2004;189(7):1265-73.
427. Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, et al. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS pathogens*. 2013;9(7):e1003504.
428. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9(8):604-15.
429. Vieira É, Keesen TS, Machado PR, Guimarães LH, Carvalho EM, Dutra WO, et al. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. *Parasite immunology*. 2013;35(2):65-72.

430. Brown JA, Greenwald RJ, Scott S, Schweitzer AN, Satoskar AR, Chung C, et al. T helper differentiation in resistant and susceptible B7-deficient mice infected with *Leishmania major*. *European journal of immunology*. 2002;32(6):1764-72.
431. Carvalho EM, Carvalho LP, Passos S, Schriefer A. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Frontiers in immunology*. 2012;3:301.
432. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(4):227-42.
433. Delgoffe GM, Powell JD. Feeding an army: The metabolism of T cells in activation, anergy, and exhaustion. *Molecular immunology*. 2015;68(2):492-6.
434. Koenen HJ, Joosten I. Blockade of CD86 and CD40 induces alloantigen-specific immunoregulatory T cells that remain anergic even after reversal of hyporesponsiveness. *BLOOD*. 2000;95(10):3153.
435. Heinzl FP, Rerko RM, Hujer AM. Underproduction of interleukin-12 in susceptible mice during progressive leishmaniasis is due to decreased CD40 activity. *Cellular immunology*. 1998;184(2):129-42.
436. Marovich MA, McDowell MA, Thomas EK, Nutman TB. IL-12p70 Production by *Leishmania major*-Harboring Human Dendritic Cells Is a CD40/CD40 Ligand-Dependent Process. 2000.
437. Resende M, Moreira D, Augusto J, Cunha J, Neves B, Cruz MT, et al. *Leishmania*-infected MHC class IIhigh dendritic cells polarize CD4+ T cells toward a nonprotective T-bet+ IFN- γ + IL-10+ phenotype. *The Journal of Immunology*. 2013;191(1):262-73.
438. Figueiredo AB, Serafim TD, Marques-da-Silva EA, Meyer-Fernandes JR, Afonso LC. *Leishmania amazonensis* impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A2B adenosine receptor activation. *European journal of immunology*. 2012;42(5):1203-15.
439. Falcão SdAC, Jaramillo TM, Ferreira LG, Bernardes DM, Santana JM, Favali CB. *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*: Differences and similarities to evade the innate immune system. *Frontiers in immunology*. 2016;7.
440. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol*. 2016;7:550.
441. Boussiotis VA. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med*. 2016;375(18):1767-78.

442. Esch KJ, Juelsgaard R, Martinez PA, Jones DE, Petersen CA. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. *J Immunol.* 2013;191(11):5542-50.
443. Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Ouaiissi A, Akharid K, Silvestre R, et al. Impairment of T cell function in parasitic infections. *PLoS neglected tropical diseases.* 2014;8(2):e2567.
444. Liang SC, Greenwald RJ, Latchman YE, Rosas L, Satoskar A, Freeman GJ, et al. PD-L1 and PD-L2 have distinct roles in regulating host immunity to cutaneous leishmaniasis. *European journal of immunology.* 2006;36(1):58-64.
445. Pentcheva-Hoang T, Chen L, Pardoll DM, Allison JP. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007;104(45):17765-70.
446. Varthaman A, Moreau HD, Maurin M, Benaroch P. TLR3-Induced Maturation of Murine Dendritic Cells Regulates CTL Responses by Modulating PD-L1 Trafficking. *PloS one.* 2016;11(12):e0167057.
447. Zangger H, Hailu A, Desponds C, Lye L-F, Akopyants NS, Dobson DE, et al. *Leishmania aethiopica* field isolates bearing an endosymbiotic dsRNA virus induce pro-inflammatory cytokine response. *PLoS neglected tropical diseases.* 2014;8(4):e2836.
448. Aduai V, Lye L-F, Akopyants NS, Zimic M, Llanos-Cuentas A, Garcia L, et al. Association of the endobiont double-stranded RNA virus LRV1 with treatment failure for human leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia. *The Journal of infectious diseases.* 2015;213(1):112-21.
449. Bourreau E, Ginouves M, Prévot G, Hartley M-A, Gangneux J-P, Robert-Gangneux F, et al. Presence of *Leishmania* RNA virus 1 in *Leishmania guyanensis* increases the risk of first-line treatment failure and symptomatic relapse. *The Journal of infectious diseases.* 2015;213(1):105-11.
450. Cantanhêde LM, da Silva Júnior CF, Ito MM, Filipin KP, Nicolete R, Salcedo JMV, et al. Further evidence of an association between the presence of *Leishmania* RNA virus 1 and the mucosal manifestations in tegumentary leishmaniasis patients. *PLoS neglected tropical diseases.* 2015;9(9):e0004079.
451. Macedo DH, Menezes-Neto A, Rugani JM, Rocha AC, Silva SO, Melo MN, et al. Low frequency of LRV1 in *Leishmania braziliensis* strains isolated from typical and atypical lesions in the State of Minas Gerais, Brazil. *Molecular and biochemical parasitology.* 2016;210(1):50-4.

452. Rao M, Valentini D, Dodoo E, Zumla A, Maeurer M. Anti-PD-1/PD-L1 therapy for infectious diseases: learning from the cancer paradigm. *Int J Infect Dis.* 2017;56:221-8.
453. Brasil, Saúde Md, Secretaria de Ciência TeIE, Tecnologia DdCe. Diretrizes metodológicas: Elaboração de Revisão Sistemática e Metanálise de estudos de acurácea diagnóstica. MS Brasília; 2014.
454. Institute JB. Joanna Briggs Institute reviewers' manual: 2014 edition. Australia: The Joanna Briggs Institute. 2014.

ANEXOS

ANEXO 1: APROVAÇÃO DO COMITÉ DE ÉTICA

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PRESENÇA DE ALTERAÇÕES OTORRINOLARINGOLÓGICAS COMO FATOR DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DA LEISHMANIOSE MUCOSA: UM ESTUDO CASO-CONTROLE

Pesquisador: Daniel Holanda Barroso

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 55237816.8.0000.5558

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.521.691

Apresentação do Projeto:

Trata-se de proposta de desenvolvimento de estudo caso-controle para a identificação de fatores de risco relacionados à leishmaniose mucocutânea. Segundo os autores, a leishmaniose é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma das cinco doenças infectoparasitárias de maior relevância, configurando-se em um problema de saúde pública mundial. Inúmeros fatores de risco são conhecidos no desenvolvimento da leishmaniose mucocutânea, porém algumas alterações otorrinolaringológicas não foram avaliadas de forma longitudinal, tais como rinite alérgica, alterações anatômicas e imunitárias presentes na mucosa nasofaríngea.

Os autores pretendem verificar fatores clínicos e laboratoriais relacionados ao acometimento mucoso em pacientes com lesão cutânea. Para tanto, serão recrutados pacientes com diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana segundo os critérios da OMS, os quais serão divididos em casos (pacientes com acometimento mucoso) e controles (pacientes sem acometimento mucoso). Os participantes serão investigados por meio de anamnese e exame clínico. As avaliações dermatológica e otorrinolaringológica serão coletadas por intermédio de questionário padronizado que inclui avaliação diagnóstica e rastreio de possíveis fatores clínicos e laboratoriais relacionados à emergência de acometimento

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 1.521.691

otorrinolaringológico. Será realizada análise multivariada para o cálculo da razão de chances e detecção de possíveis confundidores.

Dessa forma, espera-se averiguar a influência de alterações otorrinolaringológicas prévias no desenvolvimento da Leishmaniose Mucocutânea em pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo principal do estudo é identificar as alterações otorrinolaringológicas prévias como fator de risco para o desenvolvimento da leishmaniose mucocutânea.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A princípio, o estudo não oferece riscos aos participantes tendo em vista que os exames a serem realizado já fazem parte da rotina de atendimento aos pacientes com leishmaniose e os autores garantem que não serão feitos procedimentos invasivos adicionais. Para a amostra do estudo, o delineamento não oferece benefícios mas certamente haverá benefício para pacientes que futuramente venham ser atendidos no sentido de poder haver a identificação prévia de fatores de risco relacionados à leishmaniose mucocutânea.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa é factível segundo o cronograma de atividades apresentado bem como a planilha de orçamento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão adequados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sendo assim, sou de parecer favorável à aprovação do projeto de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto foi avaliado na 4ª Reunião Ordinária deste CEP. Após apresentação pelo relator e discussão pelos membros do Colegiado o projeto foi aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 1.521.691

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_656319.pdf	14/04/2016 12:44:18		Aceito
Outros	Termo_Otorrinolaringologia.jpg	14/04/2016 12:43:29	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Outros	Termo_Dermatologia.jpg	14/04/2016 12:42:46	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Outros	Termo_De_Anuencia.jpg	14/04/2016 12:35:09	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Outros	Termo_insituicao_coparticipante.jpg	14/04/2016 12:23:45	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_concordancia_instituicao_participante.pdf	14/04/2016 12:21:28	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_BR.pdf	14/04/2016 12:20:19	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DETALHADO.docx	14/04/2016 12:19:18	Daniel Holanda Barroso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	14/04/2016 12:18:40	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	09/04/2016 20:13:15	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_Encaminhamento.jpg	09/04/2016 20:08:12	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_RESPONSABILIDADE.jpg	09/04/2016 20:06:58	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Outros	Curriculo_raimunda_Nonata.pdf	09/04/2016 19:02:29	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Outros	Curriculo_Ciro_Martins_Gomes.pdf	09/04/2016 14:35:21	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Outros	Curriculo_Marcio_Nakanishi.pdf	09/04/2016 14:32:07	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Outros	Curriculo_Gustavo_Subtil.pdf	09/04/2016 14:30:09	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Outros	Curriculo_Arthur_Youssif.pdf	09/04/2016 14:28:47	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Outros	Curriculo_Daniel_Holanda_Barroso.pdf	09/04/2016 14:18:57	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_DETALHADO.docx	09/04/2016 14:16:04	Daniel Holanda Barroso	Aceito
Brochura Pesquisa	Resumo.docx	09/04/2016 14:04:26	Daniel Holanda Barroso	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 1.521.691

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 29 de Abril de 2016

Assinado por:

**Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto
(Coordenador)**

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1918

E-mail: fmd@unb.br

ANEXO II: ARTIGO APROVADO



PD-L1 May Mediate T-Cell Exhaustion in a Case of Early Diffuse Leishmaniasis Caused by *Leishmania (L.) amazonensis*

Daniel Holanda Barroso^{1,2*}, Sarah De Athayde Couto Falcão^{3,4}, Jorgeth de Oliveira Carneiro da Motta⁵, Laís Sevilha dos Santos⁶, Gustavo Henrique Soares Takano⁷, Ciro Martins Gomes^{1,4,5}, Cecília Beatriz Fiuza Favali^{3,4,8}, Beatriz Dolabela de Lima^{3,8} and Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio^{1,2,5,6}

¹Dermatocology Laboratory, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Brazil, ²Post-Graduate Program in Health Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil, ³Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil, ⁴Tropical Medicine Nucleus, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Brazil, ⁵Internal Medicine Department – Dermatology Service, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Brazil, ⁶Post-Graduate Program in Medicine, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Brazil, ⁷Pathology Service, Hospital Universitário de Brasília, Brasília, Brazil, ⁸Post-Graduate Program in Microbial Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Juarez Antonio Simões Quaresma,
Instituto Evandro Chagas, Brazil

Reviewed by:

Claudia Ida Brodskyn,
Fundação Oswaldo Cruz
(Fiocruz), Brazil
Sunil K. Arora,
Post Graduate Institute
of Medical Education
and Research, India
Sandra Marcia Muxel,
Universidade de São
Paulo, Brazil

*Correspondence:

Daniel Holanda Barroso
danielhbarroso@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 01 February 2018

Accepted: 24 April 2018

Published: 11 May 2018

Citation:

Barroso DH, Falcão SAC,
Motta JdOCd, Sevilha-Santos L,
Takano GHS, Gomes CM, Favali CBF,
Lima BD and Sampaio RNR (2018)
PD-L1 May Mediate T-Cell
Exhaustion in a Case of Early
Diffuse Leishmaniasis Caused
by *Leishmania (L.) amazonensis*.
Front. Immunol. 9:1021.
doi: 10.3389/fimmu.2018.01021

Introduction: Diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) is a rare disease form associated with *Leishmania (L.) amazonensis* in South America. It represents the “anergic” pole of American Tegumentary Leishmaniasis, and the explanation for its resistance to treatment remains elusive. We aimed to study some possible immunological mechanisms involved in the poor DCL treatment response by evaluating some cell surface molecules obtained from a patient with DCL by flow cytometry.

Case presentation: A 65-year-old DCL patient who initially failed to respond to the standard treatment for the disease showed vacuolated macrophages filled with amastigotes in lesion biopsy, and *L. (L.) amazonensis* was identified through ITS1PCR amplification. The *Leishmania* skin test and indirect immunofluorescence analysis revealed negative results. Peripheral blood from the patient was collected after a few months of treatment, when the patient presented with no lesion. Peripheral blood mononuclear cells were analyzed *ex vivo* and *in vitro* after 48 h of stimulation with soluble *L. (L.) amazonensis* antigen (SLA). Cell death, surface molecules, and intracellular molecules, such as IFN- γ and granzyme B, were analyzed in the cells using flow cytometry. Analysis of the surface markers showed an increased expression of the inhibitory molecule programmed death ligand 1 (PD-L1) in the monocytes restimulated with SLA (approximately 65%), whereas the negative controls were 35% positive for PD-L1. Conversely, compared with the negative controls, we observed a decrease in CD4⁺IFN- γ ⁺ T cells (8.32 versus 1.7%) and CD8⁺IFN- γ ⁺ T cells (14% versus 1%). We also observed a relevant decrease in the granzyme B levels in the CD8⁺ T cells, from 31% in the negative controls to 5% after SLA restimulation.

Conclusion: The dysfunctional activation of PD-L1 inhibitory pathway after *Leishmania* antigen stimulation and reduced levels of IFN-gamma and granzyme B-producing cells could be closely related to unresponsiveness to standard drug treatment of DCL patient.

Keywords: diffuse cutaneous leishmaniasis, programmed cell death-1 ligand 1, *Leishmania (L.) amazonensis*, interferon-gamma, granzyme B, T-cell exhaustion

INTRODUCTION

Even though Leishmaniasis is an important health problem, with an estimated incidence of 0.9–1.6 million each year, it is often overlooked during discussions of tropical diseases (1, 2). It is a complex zoonotic disease, with multiple animal reservoirs, and is primarily transmitted by the sandfly host (1). There is no human vaccine, and the treatment available today is based on toxic and poorly tolerated drugs (3, 4). The spectrum of clinical presentations can be divided into the following four categories: cutaneous leishmaniasis (CL), diffuse CL (DCL), mucocutaneous leishmaniasis (MCL), and visceral leishmaniasis (5). The form and severity of infection are related to the infecting *Leishmania* species, together with the host immune response (5, 6). DCL is a rare disease that affects patients showing an impaired cellular immune response against the parasite (7). *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* is the primary species associated with this disease in South America. The disease is characterized by the presence of nodules, plaques, and, in some cases, ulcerated lesions. Histopathological examinations show an abundance of *Leishmania*-infected macrophages that fail to control the infection. The treatment is frequently ineffective, and patients are administered several toxic therapies; however, they experience poor clinical responses (7). The molecular mechanisms regulating the relationship between the parasite and the affected patient are not totally understood. DCL patients frequently show impairment of the Th1/cellular response; however, it is unclear why patients show a poor response to treatment (8).

This case report describes the flow cytometric analysis of the cell expression profile of surface and intracellular molecules from a DCL patient who presented with clinical relapse following standard treatment with *N*-methyl glucamine (NMG). The study aimed to identify the possible immunological mechanisms that lead to poor responses to DCL treatment.

CASE REPORT

A male 65-year-old resident of Brasília, Federal District, Brazil, presented with an erythematous plaque on his nose one month after fishing in the state of Amazonas, Brazil (Figure 1). Samples from the lesion aspirate were inoculated and cultured in McNeal, Novy & Nicolle medium, and smears from the skin biopsies were positive for *Leishmania*. Total DNA from isolated parasites in the culture was purified for molecular analysis using the ITS1 PCR amplification and restriction fragment length polymorphism (RFLP) procedures with the HaeIII restriction enzyme (9), which identified the species as *L. (L.) amazonensis*. The *Leishmania* skin test (LST) and indirect immunofluorescence results were negative. Microscopic analysis of biopsy showed vacuolated macrophages filled with amastigote forms. All diagnostic procedures are described elsewhere (7, 10). HIV serology was negative.

The patient was initially treated with NMG (20 mg SbV/kg/day) for 20 days; however, no improvement was observed (11). The treatment was continued with the administration of 26.775 g that did not result in any improvement. After one month of not undergoing treatment, the patient resumed treatment with 20 mg

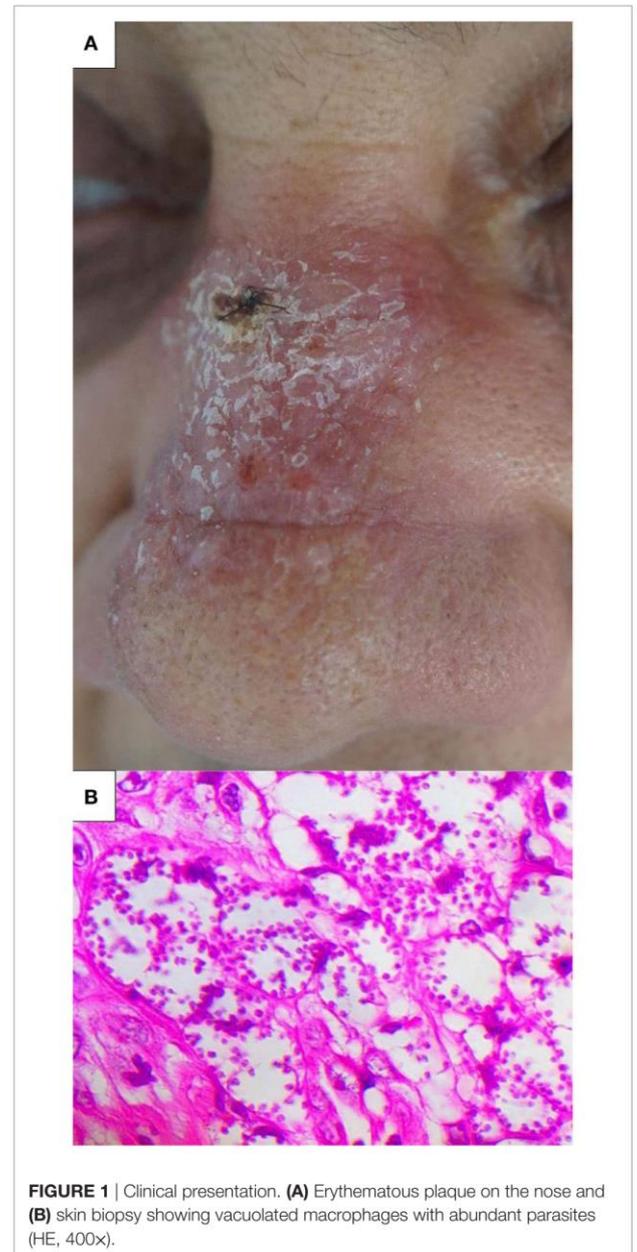


FIGURE 1 | Clinical presentation. (A) Erythematous plaque on the nose and (B) skin biopsy showing vacuolated macrophages with abundant parasites (HE, 400x).

SbV/kg/day NMG combined with allopurinol (1,200 mg/day). The NMG treatment was stopped after the administration of a 44.625 g dose due to intense myalgia. However, the patient resumed treatment one week later until the total dose reached 53.55 g. We submitted this report 14 months after the administration of the first dose of NMG. The patient was still using allopurinol at that time. To determine the possible causes of this antigen-specific immune dysfunction, we performed *ex vivo* and *in vitro* flow cytometric analysis of the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of this patient. In this way, after the patient has undergone 11 months of treatment, being only administered allopurinol and presented with no lesion, we

collected peripheral blood for immunological analysis. PBMCs were obtained through Ficoll gradient purification and analyzed *ex vivo* and *in vitro* after 48 h of stimulation with soluble *L. (L.) amazonensis* antigen (SLA). In *ex vivo* and *in vitro* experiments, the cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies to analyze the surface molecules [CD14, CD40, CD44, CD80, programmed death ligand 1 (PD-L1), HLA-DR, CD86, CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD45RA, and CD25]. For the *in vitro* experiment, positive control cells were stimulated with concanavalin A (conA). Cellular viability was assessed using Annexin V and propidium iodide (PI) labeling, acquired by flow cytometry (Verse/BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed using FlowJo software (FlowJo, Ashland, OR, USA). To evaluate the production of intracellular molecules (IFN- γ and granzyme B), Brefeldin A was added to stop protein secretion 4 h before the staining and observation by flow cytometry. The *ex vivo* (SLA unstimulated) experiments showed that the monocytes expressed higher percentages of CD14, CD40, CD44, HLA-DR, and CD86 and lower percentages of CD80 and PD-L1 (Table 1). The *in vitro* experiments showed that the cells were viable, and no differences in the cell death markers were found between the SLA-treated cells and negative controls (unstimulated) (Figure 2). We observed an increase in the expression of the inhibitory molecule PD-L1 in the monocytes restimulated *in vitro* with SLA (approximately 65%), whereas the negative

controls were 35% positive for PD-L1 (Figure 3). Additionally, 8.32% of the negative control cells were CD4⁺IFN- γ ⁺, but this percentage decreased to 1.7% after SLA stimulation. Analysis of the negative controls showed that 14% of the cells were CD8⁺IFN- γ ⁺, but this percentage decreased to 1% after SLA restimulation. We also observed a relevant decrease in granzyme B expression in CD8⁺ T cells, from 31% in the negative controls to 5% after SLA restimulation (Figure 4).

DISCUSSION

Our patient, contrary to the expected, after complete clinical response to treatment, more than a year after the disease onset and with no lesion, presented a decrease in CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD8⁺IFN- γ ⁺ after SLA restimulation. Data from literature show that a classical Th1 cytokine, IFN- γ , plays diverse roles and has different patterns of expression, depending on the infecting *Leishmania* species. In humans, *L. (L.) amazonensis* antigen is a weaker inducer of IFN- γ production by CD4⁺ T cell compared with *Leishmania (V.) braziliensis* antigen *in vitro* (12). In contrast, *in vitro* production of IFN- γ by PBMCs is the best indicator of specific immunogenicity as it has been an indicator of response to vaccine against dermatropic *Leishmania* species in humans (13). Nevertheless, IFN- γ plays a paradoxical role during the *L. (L.) amazonensis* infection. It favors antigen presentation and serves as an inducer of effector mechanisms, particularly through inducible nitric oxide synthase expression; however, it also induces chemokine expression, which leads to migration of CD4⁺ and macrophages to lesion sites, which are important in disease development (14).

These apparently contradictory findings may be explained by the chronology this cytokine production in the disease course and the *Leishmania* species studied. A human study in a *L. (V.) braziliensis* area showed that despite the low or absent IFN- γ production early in the disease, all patients with more than 60 days of cutaneous ulcers presented a strong antigen-stimulated production of IFN- γ by PBMCs (15). Regarding the effect of treatment in IFN- γ responses by human PBMCs, although one study has shown a tendency for higher levels after treatment (16) and another showed a tendency for decreased production (15), more recent reports have not shown significant

TABLE 1 | Surface molecule expression in *ex vivo* and *in vitro* monocytes.

Surface molecules	<i>Ex vivo</i>	<i>In vitro</i>		
		Medium	SLA	ConA
CD14	84.9	98.3	96	59.6
CD44	99.3	99.4	99.5	97.6
HLA-DR	88.5	86.4	94.8	25.6
CD86	90.4	78.7	81.2	5.22
CD80	0.46	25.2	32.5	5.2
CD40	91.3	97.1	97.4	71.9
Programmed death ligand 1 (PD-L1)	1.19	35.5	64.9	43.2

The patient's total peripheral blood mononuclear cells were stained with specific antibodies against monocyte surface molecules. Surface molecule expression was analyzed in a population of monocytes gated by size (FSC) and granularity (SSC).

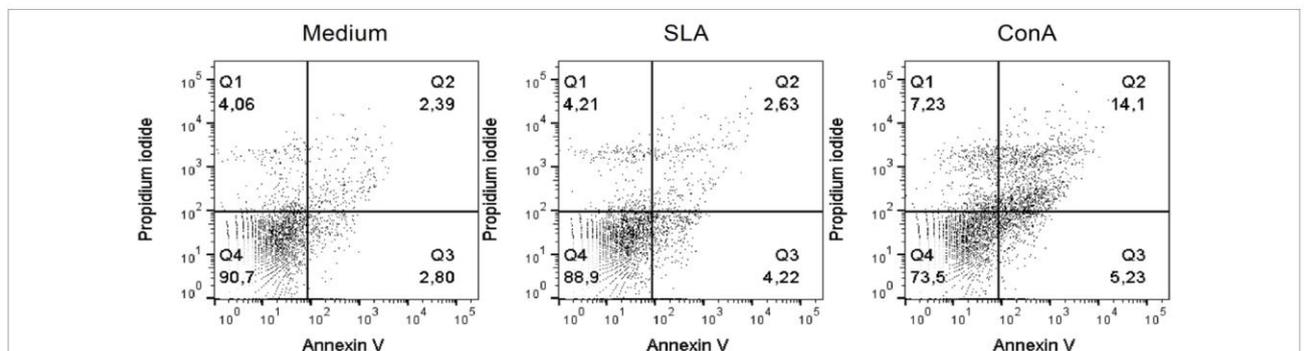
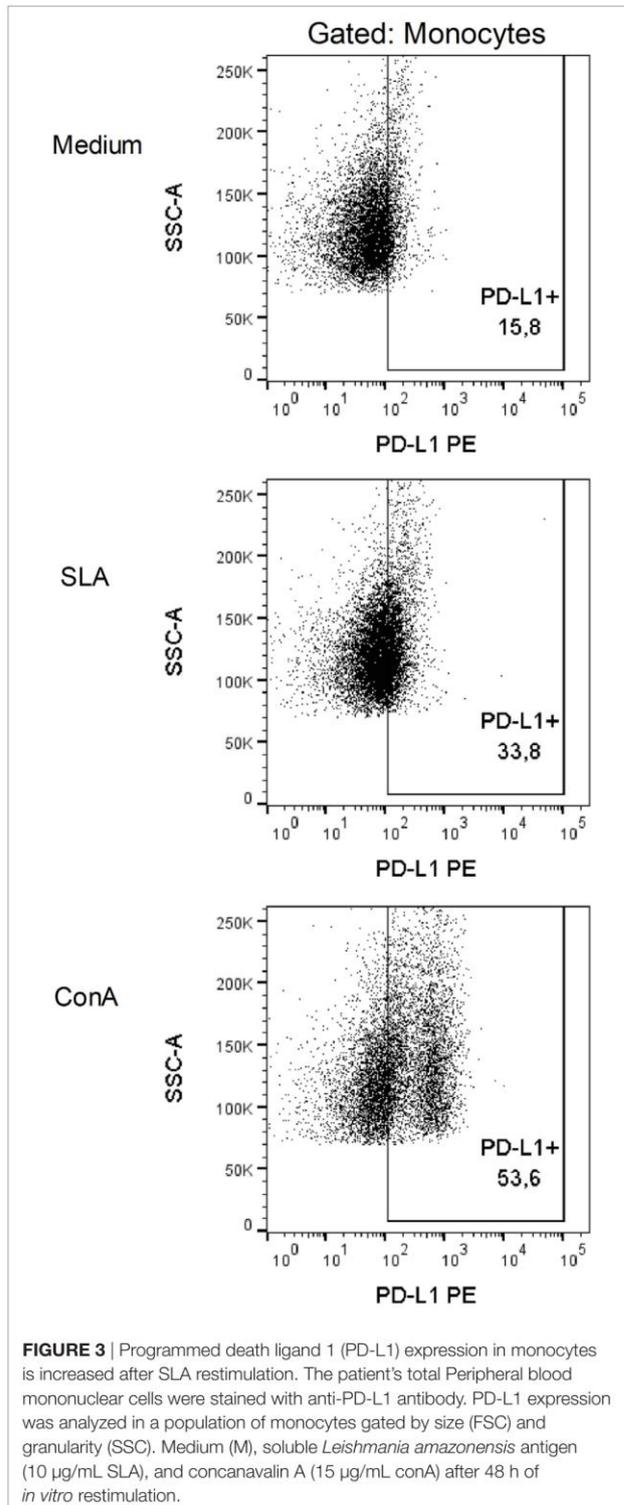


FIGURE 2 | Cellular viability of total peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after SLA stimulation. The patient's total PBMCs were stained with Annexin V and propidium iodide. Medium (M), soluble *Leishmania amazonensis* antigen (10 μ g/mL SLA), and concanavalin A (15 μ g/mL conA) after 48 h of *in vitro* restimulation.

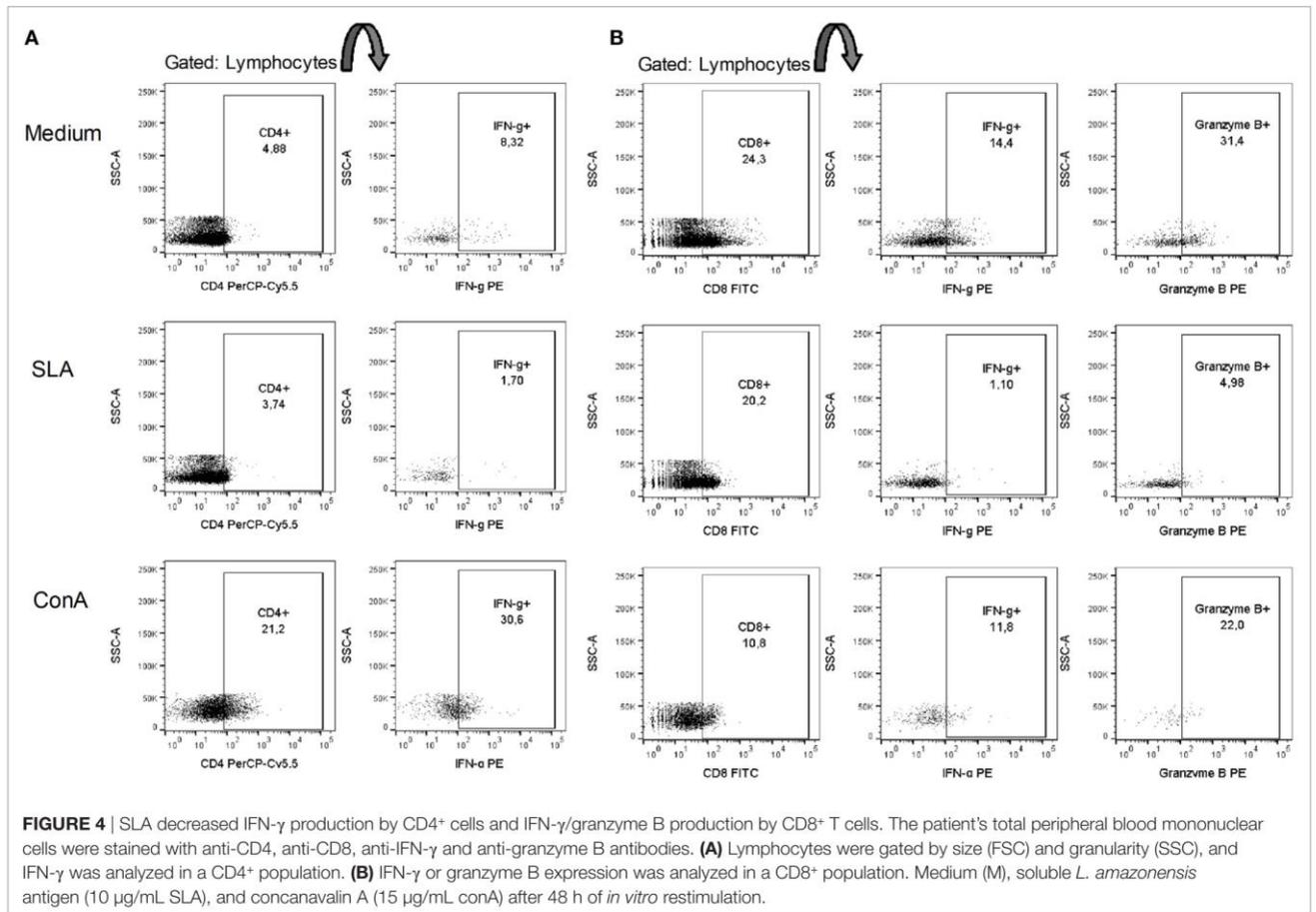


differences between patients during the active disease and after treatment (17, 18). Together, these studies suggest that IFN- γ is an important molecule in the late stages of *Leishmania* infection because it is present after treatment.

Although CD8+ IFN- γ production is generally protective in Leishmaniasis, it is suggested that their cytolytic activity is associated with pathology (19). An *in vitro* study with PBMCs from patients with localized CL (LCL) and DCL has suggested that cytotoxicity is mediated by cytotoxic granules and that it is associated with granzyme B expression (20). Granzyme B seems to be part of the acquired *Leishmania*-specific immune response (21), and it is more highly expressed in late cutaneous lesions than in early ones (22). However, it is surprising that our patient presented with diminished granzyme B expression after SLA restimulation late in the disease course and with no lesions at that point.

We also observed that the patient PD-L1 expression on monocytes differed between the SLA restimulated and the negative control. Programmed death-1 (PD-1) is an inhibitory receptor that is primarily present on the surface of activated T cells (23), whereas its ligands (PD-L1 or PD-L2) are present on a variety of cell types, including antigen-presenting cells and many non-hematopoietic cells (24). PD-1 acts as a co-inhibitory receptor during the interaction of the antigenic peptide/MHC with the T-cell receptor (TCR) (23, 24). In addition to its role in self-tolerance, PD-1 is linked to pathological antigen-specific CD8+ and CD4+ T-cell dysfunction in chronic infections and parasitic diseases. This process is called cellular exhaustion (23, 25). Exhaustion can lead to a loss in effector function by affecting the IL-2, IFN- γ , and TNF- α production of T cells, cytolytic activity and degranulation of CD8+ T cells (23, 26). Different from anergy, which is rapidly induced during the first encounter with the antigen, exhaustion is progressive over time (27), and the IFN- γ production and capacity to degranulate seems to be lost later, when the process is advanced (27, 28). In the present study, after SLA restimulation, we observed a decrease in IFN- γ expression by CD4+ and CD8+ and granzyme B expression by CD8+. In contrast, PD-L1 expression increased in the presence of SLA. CD8+ T-cell exhaustion has been previously suggested in Diffuse Leishmaniasis caused by *Leishmania* (*L.*) *mexicana* (20). These results suggest that the increase in the PD-L1 expression observed in this work might be a mechanism that parasites exploit to avoid the immune response. Our findings suggest that PD-L1 expression by monocytes might play a role in CD8+ and CD4+ T-cell dysfunction in DCL. Interestingly, this T-cell dysfunction was observed months after the initiation of the Leishmaniasis treatment, despite the increase of costimulatory molecules after SLA stimulation, and it resulted in low IFN- γ in CD8+ and CD4+ and granzyme B on CD8+. Together it is possible to assume that, as a consequence of the chronic exposition to the *Leishmania* antigen, this patient presented with T-cell exhaustion that persisted despite clinical cure. This is in accordance with the concept that exhaustion takes between 2 and 5 weeks to develop and affects both cytotoxic and helper functions, and exhausted cells do not recover their functions even after the removal of the antigen (28, 29).

Our patient showed a higher percentage of CD8 T cells than CD4 T in the unstimulated condition. One possibility is that the treatment was sufficient, by this time of immunological evaluation, to restore the CD8 T cells numbers and not



CD4 T cells. This observation can suggest a different role of CD8 T lymphocytes in our DCL patient. In fact, data from literature show that the number of CD4 and CD8 lymphocytes from DCL patients peripheral blood can be altered during the healing process, increasing 86.5 and 37%, respectively and normalizing the CD4/CD8 ratio. In a moment prior to treatment, the CD8 T cells from DCL patients were found diffusely distributed by the inflammatory tissue, whereas after the treatment, a higher number of CD8 T lymphocytes was found localized in the inflammatory infiltrate. However, 5 months after the end of the treatment, CD8 T cells decreased to abnormal numbers in the peripheral blood (30). We observed a decrease of IFN- γ and granzyme B in SLA stimulated CD8⁺ cells. The viable CD8 T cells from lesion of DCL patients caused by *L. mexicana* showed a decrease in cytotoxicity, antigen-specific proliferation and IFN- γ production after co-culture with macrophages infected with this parasite. This anergic response by CD8 T cells was restored after stimuli by two TLR2 antagonists (LPG and Pam3Cys). Also, PD-1 expression on CD8 T cells was decreased after the stimuli (20). All these results suggest that the low presence of CD4 cells and, mainly, the anergic CD8 cells can be contributing to unresponsiveness to treatment and probably, to the persistence of DCL.

Diffuse CL is associated with difficult therapeutic management and is often a chronic infection (31). PD-1 blockade using monoclonal antibodies is currently under investigation for the treatment of other chronic infectious diseases and has shown promising results (32). Thus, studying this receptor in DCL is a relevant step toward the development of better therapeutic strategies. The patient showed good clinical results after combination treatment with NMG and allopurinol. Early diagnosis and treatment are crucial for achieving a satisfactory clinical outcome. As shown by our results, despite treatment and a patient without lesions at the time of immunological evaluation, a selective exhausted state can persist after *Leishmania* antigen stimulation and this state is possibly caused by the induction of the PD-L1 inhibitory pathway, once we observed a higher expression of PDL-1 in monocytes.

The increase in PD-L1 expression was also observed through recognition of polyI:C by TLR3 in a CD40/CD40L interaction and NF κ B-dependent manner (33). Although TLR3 is a receptor that recognizes double-stranded RNA (dsRNA), many studies have identified the presence of *Leishmania* RNA virus (LVR) in several *Leishmania* species, such as *L. (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (L.) aethiops*, *Leishmania (L.) major*, and *Leishmania (L.)*

infantum (33–37). Murine studies have found an increase in cytokine and chemokine production, susceptibility to parasites, footpad swelling and parasitemia after *Leishmania* infection and recognition by TLR3 (38). Moreover, the presence of the LVR in *Leishmania* has been associated with non-response to treatment. In a recent cohort of 76 American Tegumentary Leishmaniasis patients, subjects infected with *L. (V.) guyanensis* that carried LVR did not respond to treatment, while subjects with *Leishmania* without the RNA virus did respond to treatment (36). Treatment failure was also observed during *L. (V.) braziliensis* with LVR infection (37). A study performed in the state of R ndonia found an association of mucosal Leishmaniasis and the presence of the RNA virus in *Leishmania* species (39). In the same study, LVR was found in *L. (L.) amazonensis* isolated from two patients (39). Although the state of Minas Gerais has a low incidence of LVR in *L. (V.) braziliensis*, most prospective studies that identified the presence of LVR1 are from the Amazonian region (40). In this way, it is worth on note that our patient reported having been in the state of Amazonas before the onset of the lesions. *In vitro* experiments showed an increase in PD-L1 expression and the exhaustion of CD4+ and CD8+ T cells after SLA stimulation. Thus, we suggest that LVR is present in *L. (L.) amazonensis* and recognized by TLR3, which would trigger the increase in PD-L1 expression, leading to the exhaustion of T cells, as evidenced by the decrease in the expression of IFN- γ and granzyme B.

Based in our *in vitro* experiments results, we suggest that PD-L1 inhibitory pathway may be related to unresponsiveness to standard drug treatment of DCL patient.

ETHICS STATEMENT

Written informed consent was obtained from the patient prior to collect the biological samples. The authors state that they have obtained a written consent from the patient to publish this case report in this journal.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DB, SF, CF, BL, and RS conceived and designed the study. SF and BL performed the experiments. DB, SF, CF, LS, BL, and RS contributed to data analysis. LS processed the diagnostic samples to culture and direct examination. DB, JM, GT, CG, and RS contributed to patient clinical managing. CF, BL, and RS provided materials and infrastructural support. DB, SF, CG, CF, BL, and RS wrote and revised the article.

FUNDING

This work was supported by grants 16854.78.40785.2604/2017, 0193.001447/2016 and 0193.000903/2015 from Fundação de Apoio   Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF).

REFERENCES

- Hotez PJ, Remme JH, Buss P, George G, Morel C, Breman JG. Combating tropical infectious diseases: report of the disease control priorities in developing countries project. *Clin Infect Dis* (2004) 38(6):871–8. doi:10.1086/382077
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* (2012) 7(5):e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
- Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis* (2011) 15(8):e525–32. doi:10.1016/j.ijid.2011.03.021
- Kumar R, Engwerda C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin Transl Immunol* (2014) 3(3):e13. doi:10.1038/cti.2014.4
- Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M. New world cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol* (2010) 63(2):309–22. doi:10.1016/j.jaad.2009.06.088
- Colmenares M, Kar S, Goldsmith-Pestana K, McMahon-Pratt D. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (2002) 96:S3–7. doi:10.1016/S0035-9203(02)90044-1
- Gomes CM, Paula NA, Morais OO, Soares KA, Roselino AM, Sampaio RN. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol* (2014) 89(5):701–9. doi:10.1590/abd1806-4841.20142389
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2004) 99(3):239–51. doi:10.1590/S0074-02762004000300001
- Sch nian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples1. *Diagn Microbiol Infect Dis* (2003) 47(1):349–58. doi:10.1016/S0732-8893(03)00093-2
- Gomes CM, Cesetti MV, de Paula NA, Vernal S, Gupta G, Sampaio RN, et al. Field validation of SYBR green- and TaqMan-based real-time PCR using biopsy and swab samples to diagnose American tegumentary leishmaniasis in an area where *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* is endemic. *J Clin Microbiol* (2017) 55(2):526–34. doi:10.1128/JCM.01954-16
- World Health Organization ECotcol. *Control of the Leishmaniases: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases*. World Health Organization (2010).
- Macedo AB, Sánchez-Arcila JC, Schubach AO, Mendonça S, Marins-Dos-Santos A, de Fatima Madeira M, et al. Multifunctional CD4+ T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* (2012) 167(3):505–13. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04536.x
- Mendonca SC, De Luca PM, Mayrink W, Restom TG, Conceicao-Silva F, Da-Cruz AM, et al. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* (1995) 53(2):195–201. doi:10.4269/ajtmh.1995.53.195
- Carneiro MB, Lopes ME, Vaz LG, Sousa LM, dos Santos LM, de Souza CC, et al. IFN- γ -dependent recruitment of CD4+ T cells and macrophages contributes to pathogenesis during *Leishmania amazonensis* infection. *J Interferon Cytokine Res* (2015) 35(12):935–47. doi:10.1089/jir.2015.0043
- Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho E. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* (1998) 31(1):143–8. doi:10.1590/S0100-879X1998000100020
- Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, De Luca PM, Mendonça SC, Bertho AL, et al. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania* pifanoiamastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp Parasitol* (1996) 84(2):144–55. doi:10.1006/expr.1996.0100
- Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* (2002) 9(2):251–6. doi:10.1128/CDLI.9.2.251–256.2002
- de Assis Souza M, de Castro MCB, de Oliveira AP, de Almeida AF, de Almeida TM, Reis LC, et al. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. *Microb Pathog* (2013) 57:27–32. doi:10.1016/j.micpath.2013.02.004

19. Novais FO, Scott P, editors. CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. *Semin Immunopathol* (2015) 37(3):251–9. doi:10.1007/s00281-015-0475-7
20. Hernández-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y, et al. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis* (2010) 4(11):e871. doi:10.1371/journal.pntd.0000871
21. Bousoffara T, Louzir H, Salah AB, Dellagi K. Analysis of granzyme B activity as a surrogate marker of *Leishmania*-specific cell-mediated cytotoxicity in zoonotic cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* (2004) 189(7):1265–73. doi:10.1086/382031
22. Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, et al. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog* (2013) 9(7):e1003504. doi:10.1371/journal.ppat.1003504
23. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. *Front Immunol* (2016) 7:550. doi:10.3389/fimmu.2016.00550
24. Boussiotis VA. Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway. *N Engl J Med* (2016) 375(18):1767–78. doi:10.1056/NEJMr1514296
25. Esch KJ, Juelsingaard R, Martinez PA, Jones DE, Petersen CA. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. *J Immunol* (2013) 191(11):5542–50. doi:10.4049/jimmunol.1301810
26. Butler NS, Moebius J, Pewe LL, Traore B, Doumbo OK, Tygrett LT, et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium* infection. *Nat Immunol* (2012) 13(2):188–95. doi:10.1038/ni.2180
27. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol* (2011) 12(6):492–9. doi:10.1038/ni.2035
28. Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Ouassii A, Akharid K, Silvestre R, et al. Impairment of T cell function in parasitic infections. *PLoS Negl Trop Dis* (2014) 8(2):e2567. doi:10.1371/journal.pntd.0002567
29. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* (2015) 15(8):486–99. doi:10.1038/nri3862
30. Salaiza-Suazo N, Volkow P, Tamayo R, Moll H, Gillitzer R, Pérez-Torres A, et al. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Trop Med Int Health* (1999) 4(12):801–11. doi:10.1046/j.1365-3156.1999.00491.x
31. Hashiguchi Y, Gomez EL, Kato H, Martini LR, Velez LN, Uezato H. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Trop Med Health* (2016) 44:2. doi:10.1186/s41182-016-0002-0
32. Rao M, Valentini D, Dodoo E, Zumla A, Maeurer M. Anti-PD-1/PD-L1 therapy for infectious diseases: learning from the cancer paradigm. *Int J Infect Dis* (2017) 56:221–8. doi:10.1016/j.ijid.2017.01.028
33. Varthaman A, Moreau HD, Maurin M, Benaroch P. TLR3-induced maturation of murine dendritic cells regulates CTL responses by modulating PD-L1 trafficking. *PLoS One* (2016) 11(12):e0167057. doi:10.1371/journal.pone.0167057
34. Hajjaran H, Mahdi M, Mohebbi M, Samimi-Rad K, Atefi-Pirkooch A, Kazemi-Rad E, et al. Detection and molecular identification of *Leishmania* RNA virus (LRV) in Iranian *Leishmania* species. *Arch Virol* (2016) 161(12):3385–90. doi:10.1007/s00705-016-3044-z
35. Zangger H, Hailu A, Desponds C, Lye L-F, Akopyants NS, Dobson DE, et al. *Leishmania aethiopia* field isolates bearing an endosymbiotic dsRNA virus induce pro-inflammatory cytokine response. *PLoS Negl Trop Dis* (2014) 8(4):e2836. doi:10.1371/journal.pntd.0002836
36. Bourreau E, Ginouves M, Prévot G, Hartley M-A, Gangneux J-P, Robert-Gangneux F, et al. Presence of *Leishmania* RNA virus 1 in *Leishmania guyanensis* increases the risk of first-line treatment failure and symptomatic relapse. *J Infect Dis* (2015) 213(1):105–11. doi:10.1093/infdis/jiv355
37. Adau V, Lye L-F, Akopyants NS, Zimic M, Llanos-Cuentas A, Garcia L, et al. Association of the endobiont double-stranded RNA virus LRV1 with treatment failure for human leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia. *J Infect Dis* (2015) 213(1):112–21. doi:10.1093/infdis/jiv354
38. Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, et al. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science* (2011) 331(6018):775–8. doi:10.1126/science.1199326
39. Cantanhêde LM, da Silva Júnior CF, Ito MM, Felipin KP, Nicolette R, Salcedo JMV, et al. Further evidence of an association between the presence of *Leishmania* RNA virus 1 and the mucosal manifestations in tegumentary leishmaniasis patients. *PLoS Negl Trop Dis* (2015) 9(9):e0004079. doi:10.1371/journal.pntd.0004079
40. Macedo DH, Menezes-Neto A, Rugani JM, Rocha AC, Silva SO, Melo MN, et al. Low frequency of LRV1 in *Leishmania braziliensis* strains isolated from typical and atypical lesions in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mol Biochem Parasitol* (2016) 210(1):50–4. doi:10.1016/j.molbiopara.2016.08.005

Conflict of Interest Statement: The authors certify that they have no commercial or financial relationships that could be a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Barroso, Falcão, Motta, Sevilha-Santos, Takano, Gomes, Favali, de Lima and Sampaio. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.