

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

DANIEL HOLANDA BARROSO

ESTUDO DOS FATORES CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS À
DISSEMINAÇÃO DE *LEISHMANIA SP* PARA A MUCOSA NASAL E AVALIAÇÃO
DA SEGURANÇA DE ANTÍGENO DE MONTENEGRO EM CAMUNDONGOS

Brasília
2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

DANIEL HOLANDA BARROSO

ESTUDO DOS FATORES CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS À
DISSEMINAÇÃO DE *LEISHMANIA SPP* PARA A MUCOSA NASAL E AVALIAÇÃO
DA SEGURANÇA DE ANTÍGENO DE MONTENEGRO EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de doutor e em Ciências médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Médicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio.

Brasília

2022

DANIEL HOLANDA BARROSO

ESTUDO DOS FATORES CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS À
DISSEMINAÇÃO DE *LEISHMANIA SPP* PARA A MUCOSA NASAL

Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências da Médicas pelo Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Médicas
da Universidade de Brasília.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Professora Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio (presidente)

Universidade de Brasília – UnB

Professor Dr. Valdir Sabbaga Amato

Universidade de São Paulo – USP

Professora Dra. Cecilia Beatriz Fiuza Favali

Universidade de Brasília – UnB

Dr. Marcio Nakanishi

Universidade de Brasília – UnB

Dra. Patricia Shu Kurizky (suplente)

Hospital Universitário de Brasília - HUB

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.

A Dr. Gustavo Subtil Magalhães Freire e ao serviço de Otorrinolaringologia do Hospital Unversitário de Brasília que foram fundamentais para realização e interpretação dos exames endoscópicos nasais.

Aos Prof. Dr. Otávio de Toledo Nóbrega e Carla Nunes de Araújo que foram responsáveis pela concepção e execução das medidas de citocinas no soro.

Aos estudantes Agatha Christie Bruschi Birriel Mariani e Maxwell Miguel Barbosa Cordeiro Toledo que foram essenciais na conclusão dos experimentos com camundongos

A estudante Mariana Roumillac de Oliveira pelo trabalho pelo auxílio com a avaliação sistemática das fotografias.

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.

Dra Veronica Maria Gonçalves Furtado pelos ensinamentos e por auxiliar na discussão da parte de Histopatologia.

A Abedias da Rocha Barroso, meu pai, e Maria Codeira Holanda Barroso, minha mãe, pela ajuda da resolução de formalidades necessárias a concretização deste projeto e na criação de coelhos necessários a confecção do meio de cultura.

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

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

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

À Laís Sevilha dos Santos que auxiliou na interpretação dos testes de biologia molecular.

A Tércio Rodrigues, Luciana Pereira Freire Martins, Renata Velozo Timbo e Viviane Medeiros Silva que possibilitaram a realização dos exames de parasitologia.

Ao instituto de Biologia da Universidade de Brasília que disponibilizou es 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: Uma parte dos pacientes com Leishmaniose tegumentar americana desenvolvem lesões mucosas com conseqüentes deformidades. A compreensão da fisiopatogênese da forma mucosa é limitada pelo escasso conhecimento dos fatores associados à disseminação do parasito e pelo grande intervalo de tempo que pode existir entre o desenvolvimento das lesões cutânea e mucosa da doença.

Objetivo: Avaliar fatores clínicos e imunológicos associados à disseminação de *Leishmania spp* para a mucosa nasal através de avaliação clínica e laboratorial sistematizada. Além disso procuramos validar novo antígeno de leishmania produzido na UnB.

Métodos: Foi realizado estudo transversal onde foram incluídos consecutivamente pacientes atendidos no ambulatório de Leishmaniose do Hospital Universitário de Brasília. Os pacientes foram submetidos a fotografias sistematizadas das lesões e os exames dermatológico/otorrinolaringológico foram registrados em fichas específicas. Citocinas inflamatórias foram medidas no soro. O desfecho principal foi a presença de DNA de leishmania em swab nasal realizada por PCR. Também foi testado antígeno derivado da cepa MHOM/BR/PH8 o qual foi inoculado em camundongos B57BL/6 com avaliação de segurança por parâmetros clínicos, laboratoriais e histopatológicos.

Resultados: Para avaliar a associação entre os níveis de citocinas IL-12, IL-6, TNF- α , IL-10, IL-1 β e IL-8 e a presença de leishmania em mucosa nasal foi construído um modelo de regressão de Poisson considerando interações multivariadas de características clínicas e laboratoriais. Dos 79 pacientes com Leishmaniose cutânea, 24 (30%) apresentavam DNA de *L. (V.) braziliensis* na mucosa nasal. No modelo multivariado, a presença de DNA do parasito na mucosa foi associada à redução dos níveis de IL-12 (RP = 0,440; p = 0,034), aumento dos níveis de IL-6 (RP = 1,001; p = 0,002) e maior número de afetados segmentos corporais (RP = 1,65; p <0,001). Em um segundo modelo as áreas de infiltração, mácula e eritema foram maiores em pacientes com a disseminação de leishmania para a mucosa nasal, mas a associação não foi significativa. Após a aplicação do antígeno derivado da cepa MHOM/BR/PH8 foi verificada infecção por leishmania em um dos camundongos. Não foram verificados outros sinais clínicos, laboratoriais e histopatológicos de toxicidade em nenhum dos outros camundongos.

Conclusões: O modelo multivariado sugeriu que a indução de um perfil Th1 com a produção de IL-12 é importante para prevenir a disseminação de *L. (V.) braziliensis* para a mucosa. Observamos uma taxa de disseminação precoce de *Leishmania spp* para a mucosa nasal maior do que a descrita anteriormente. O antígeno testado no estudo produziu possível infecção em um dos camundongos, não sendo seguro para testes em humanos.

Palavras chave: Leishmaniose, mucosa, imunologia, análise multivariada

ABSTRACT

Introduction: A portion of patients with American Tegumentary Leishmaniasis develop mucosal lesions with consequent deformities. The understanding of the pathophysiology of the mucosal form is limited by the limited knowledge of the factors associated with the dissemination of the parasite and by the large time interval that may exist between the development of the disease's cutaneous and mucosal lesions.

Objective: To evaluate clinical and immunological factors related to the spread of *Leishmania* spp to the nasal mucosa through systematic clinical and laboratory evaluation. In addition, we seek to validate a new leishmania antigen produced at UnB.

Methods: A cross-sectional study was carried out in which patients treated at the leishmaniasis outpatient clinic of Hospital Universitário de Brasília were consecutively included. The patients were submitted to systematic photographs of the lesions and dermatological/otorhinolaryngological exams were registered in specific forms. Inflammatory cytokines were measured in serum. The main outcome was the presence of leishmania DNA in a nasal swab performed by PCR. An antigen derived from the MHOM/BR/PH8 strain was also tested and inoculated in B57BL/6 mice with safety assessment by clinical, laboratory and histopathological parameters.

Results: To assess the association between the levels of cytokines IL-12, IL-6, TNF- α , IL-10, IL-1 β and IL-8 and the presence of leishmania in the nasal mucosa, a Poisson regression model was built, considering multivariate interactions of clinical and laboratory characteristics. Of the 79 patients with cutaneous leishmaniasis, 24 (30%) had *L. (V.) braziliensis* DNA in the nasal mucosa. In the multivariate model, the presence of parasite DNA in the mucosa was associated with reduced IL-12 levels (RP = 0.440; $p = 0.034$), increased IL-6 levels (PR = 1.001; $p = 0.002$) and greater number of affected body segments (PR = 1.65; $p < 0.001$). In a second model, the areas of infiltration, macula and erythema were greater in patients with spread of leishmania to the nasal mucosa, but the association was not significant. After application of the antigen derived from the MHOM/BR/PH8 strain, infection by leishmania was verified in one of the mice. There were no other clinical, laboratory and histopathological signs of toxicity in any of the other mice.

Conclusions: The multivariate model suggested that the induction of a Th1 profile with the production of IL-12 is important to prevent the spread of *L. (V.) braziliensis* to the mucosa. We observed a higher rate of early spread of *Leishmania* spp to the nasal mucosa than previously described. The antigen tested in the study produced a possible infection in one of the mice, and was not safe for testing in humans.

Keywords: leishmaniasis, immunology, multivariate analysis, mucocutaneous,

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Crânio encontrado no Sítio arqueológico de Makat-Tampu: Trata se de crânio de um Homen de aproximadamente 35-45 anos de idade com lesão lítica em osso palatino formando uma curvatura suave e bordos arredondados e ondulantes que contorna o osso e exhibe sinais de neovascularização. Observa-se ainda a ausência de cornetos nasais. Foi observada ainda fratura de espinha nasal anterior incluindo a destruição parcial do maxilar sem reação periosteal. A borda da lesão é arredondada reta e fina-adaptado de ALTAMIRANO-ENCISO 2001(6).....28
- Figura 2: **A:** Peça "Figura antropomórfica sentada: representação do doente" (Fotografo: Martin Franke) **B:** Peça "Apresentação do doente: Leishmaniose"(Fotógrafa: Sandra Steiß). Ambas estão no Museu Etnológico de Berlin. As peças são da cultura Mocha 0-600 D.C e representam cabeça antropomórfica com bico na parte de trás e mostram lábios e nariz deformados por conta da doença. Wilhelm Gretzer (1847 - 1926) © Foto: Museu Etnológico dos Museus do Estado de Berlim - Patrimônio Cultural Prussiano. A- URL: <http://www.smb-digital.de/eMuseumPlus?service=ExternalInterface&module=collection&objectId=44921&viewType=detailView> B- URL:<http://www.smb-digital.de/eMuseumPlus?service=ExternalInterface&module=collection&objectId=2939&viewType=detailView>.....28
- Figura 3- Ilustração presente no artigo de Montenegro de 1926, no qual o autor descreve a formação de vesícula, após reação ao extrato de Leishmania- Montenegro 1926-(11).30
- Figura 4: Estado da endemicidade de LC no mundo em 2018 segundo a OMS- (adaptado de: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/->>. Acesso em: 24 abril. 2021).....31
- Figura 5- Mapas da distribuição geográfica da Leishmaniose tegumentar na América Latina - Fonte – referência (27).....36
- Figura 6- Incidência de Leishmaniose cutânea/mucosa por 100.000 habitantes, segundo nível administrativo subnacional, Região das Américas, 2019- Adaptado de ref(54) disponível em <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>.38
- Figura 7- Frequência de relatos de Infecção por *Leishmania spp.* por hospedeiro nas américas- adaptado da referência (57).....39

Figura 8- Úlcera de bordas elevadas típica de Leishmaniose- Fonte: Arquivo pessoal.....	42
Figura 9- Leishmaniose disseminada em paciente envolvendo tronco e membros- Fonte- arquivo pessoal.....	44
Figura 10- Placas, nódulos e pápulas não ulceradas em paciente com Leishmaniose difusa. Fonte arquivo pessoal.	46
Figura 11- LC atípica zosteriforme em face lateral esquerda de tórax- fonte: arquivo pessoal.....	48
Figura 12- LC atípica forma lupóide- apresentando se como múltiplas placas algumas com exulcerações centrais em cotovelo e braço direitos. Fonte: arquivo pessoal.	49
Figura 13- LC atípica simulando Lúpus pernio apresentando-se como placa violácea em dorso nasal associada a áreas de exulceração. Fonte: Arquivo pessoal.....	50
Figura 14- LC atípica apresentando-se como lesão tumoral em região palpebral esquerda- Fonte arquivo pessoal.	51
Figura 15- LC atípica apresentando se como placa violácea associada a exulcerações com configuração cribriforme. Fonte: arquivo pessoal	52
Figura 16- LC atípica apresentando-se como múltiplas úlceras em membro inferior esquerdo e que foi tratada em outro serviço como úlcera vascular. Fonte: Arquivo pessoal.	52
Figura 17- LC forma atípica apresentando-se como múltiplas úlceras e fístulas em membro inferior direito simulando micetoma. Formas amastigotas foram encontradas por Imunohistoquímica. Fonte: Arquivo pessoal.....	54
Figura 18- Leishmaniose disseminada associada a lesão mucosa em palato- Fonte- Arquivo pessoal.	54
<i>Figura 19- Aspectos clínicos da Leishmaniose mucosa em diferentes fases da doença segundo Lessa(137) . (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</i>	

- 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-(137).....58*
- Figura 20 — 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 (13).....62
- Figura 21 — 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); D- Formas amastigotas em cortes histológicos (setas longas), com núcleos (seta curta) em uma observa-se cinetoplasto(ponta de seta)(203).....65
- Figura 22- Purificação do DNA por técnica "Salting out". Adaptado de Roselino e Cols(226).....68
- Figura 23- Isolamento do DNA em fase sólida (coluna de sílica)- Adaptado de Buckingham 2019(229).69
- Figura 24- Reação em cadeia da polimerase etapas e temperaturas de acordo com Roselino e cols(226).....70
- Figura 25: Identificação de diferentes espécies de *Leishmania* utilizando o corante intercalante Sybr Green e os iniciadores MaryF-MaryR- Adaptado de Cecarelli 2014(249).....72
- Figura 26- Três exemplos de PCRs em tempo real. 1- Sondas Taqman; 2- Sondas de transferência de energia ressonante por fluorescência (FRET); 3- Sondas Scorpion. Adaptado de VerWeij e cols(238).....73
- Figura 27- Exame histopatológico Camundongo 616A10 preparo H&E, x20- Infiltrado inflamatório linfocitocitário intersticial com raros neutrófilos sem a formação de granulomas- padrão de reação inflamatória exsudativa crônica.89
- Figura 28- Exame histopatológico Camundongo 616A10 preparo com óleo de imersão H&E, x100- Círculo preto- amastigota na derme.90

- Figura 29- Exame histopatológico camundongo 719A100- Epiderme retificada e infiltrado linfocitário na derme associada a fibrose sugestivo de cicatriz H&E x20 91
- Figura 30- Vias do complemento- adaptado de Dunkelberguer 2010(353)..... 103
- Figura 31- Funções dos LPG na virulência da Leishmania- PAMPs= do inglês, Padrões moleculares associados a patógenos; PRR= do inglês receptores de padrão; LPG= do inglês-Lipofosfoglicana; iNOS- Sintase de óxido nítrico induzível; ROS- Do inglês, Espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Fraco 2012 e cols(359) 104
- Figura 32: 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) têm 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. Além disso, pacientes que não tiveram recidiva de LM tiveram maiores expressão tecidual de IL-10, mostrando a importância de seu papel regulador(405). Receptores inibitórios em células CD8+ e CD4+ (PD-1, CTLA-4, LAG3) e seus contra ligantes (CD80, CD86, PD-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; **LDPC**: Leishmaniose dérmica pós calazar; **LC**: Leishmaniose cutâneo localizada; **LR**: Leishmaniose residivans cútis; **LD**: Leishmaniose disseminada; **LCM**: 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(408) 109
- Figura 33: Explicando confundimento- A aparente associação ente beber café e câncer de pulmão é neste caso decorrente de um fator de confundimento, quem bebe café tende a fumar. 113

Figura 34- Fluxograma mostrando pacientes inicialmente rastreados e que preencheram os critérios de inclusão.....	120
Figura 35- Fluxograma para o diagnóstico de LTA	137
Figura 36- Imagem de lesão com escala	139
Figura 37- Com a utilização da escala como referência para as medidas	140
Figura 38- A área de interesse é demarcada(círculo amarelo) sendo sua área medida através do programa- no caso foi medida a área de úlcera.	140
Figura 39- Fluxograma do estudo	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diagnósticos diferenciais da Leishmaniose adaptado de Gurel e cols(107)	47
Tabela 2- Classificação em estágios da LM em mucosa nasal adaptado de Lessa e cols 2012(137)	57
Tabela 3- Resultados dos exames bioquímicos realizados nos camundongos por grupo	87
Tabela 4: Valores de referência de exames laboratoriais para camundongos B57BL/6 encontrados na literatura. †referência Spinelli 2012(296), e ‡ Almeida 2008(297).	87
Tabela 5- Resultados dos exames bioquímicos realizados nos camundongos	91
Tabela 6- Características básicas da população	119
Tabela 7: Pacientes que confirmaram Leishmaniose mucosa após investigação com otorrinolaringológica	120
Tabela 8- Características da população por grupos	121
Tabela 9- Características da população- variáveis quantitativas	142
<i>Tabela 10- Características da população- variáveis categóricas</i>	<i>142</i>
Tabela 11 - Características da população- variáveis quantitativas, por subgrupo com medidas de associação na análise univariada	143
Tabela 12- Características da população variáveis categóricas por subgrupo- por subgrupo com medidas de associação na análise univariada	143

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Características clínicas e epidemiológicas das espécies de Leishmania, adaptado de Burza e cols(25).	35
Quadro 2 — Padrões histopatológicos da Leishmaniose tegumentar	75
Quadro 3 — Achados Histopatológicos segundo a forma clínica. Adaptados de Choi e cols 2002(268).	76

Quadro 4: Código de identificação dos camundongos-.....	84
Quadro 5: Principais diferenças entre os sistemas imunes inato e adaptativo.....	101
Quadro 6- Características das citocinas estudadas	111



LISTA DE ABREVIações E Códigos

- AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês: Acquired Immunodeficiency Syndrome)
- ALA: Antígeno de L. (L.) amazonensis
- AN: Ácido nucleico
- BCG: bacilo calmette-guerin
- 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)
- CEUA: Comissão de Ética no Uso Animal
- COBEA: Comissão Nacional de Bem-Estar Animal
- ConA: Concanavalina A
- CG: Citosina e Guanina
- CLRs: Receptores de lecitina tipo C (do inglês: C-type lectin receptors)
- CPPI: Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos
- CS: Controles Sem Leishmaniose
- CT: Controles
- Ct: Ciclo limiar(do inglês: cycle threshold)
- 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)
- DNA: Acido desoxirribonucleico, (do inglês- Deoxyribonucleic acid)

dsRNA: Acido Ribonucleico de Dupla Hélice (do inglês: double – stranded ribonucleic acid)

DP: Disseminação precoce

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

FAM: 6- Carboxifluoreceína

FBS: Soro Bovino Fetal (Do inglês: fetal bovine sérum)

Fc: Região “Fragmentos Cristalizáveis” (Do inglês: fragment crystallizable region)

FOXP3: forkhead box P3

FRET - transferência de energia ressonante por fluorescência (do inglês: fluorescence resonance energy transfer)

GP63: Glipoproteína 63

GIPLs: Fosfolipídios de Glicoinositol (Do inglês: Glycoinositolphospholipids)

γ-GT- Gama Glutamil transferase

gRNA: RNA guia (do inglês: Guide ribosomal ribonucleic acid)

HLA: Antígeno Leucocitário Humano

HP: Histopatológico

HSP70- proteína de choque térmico de 70 quilodalton(do inglês- Heat shock protein)

H&E- hematoxilina-eosina

IDRM: Intradermoreação de Montenegro

IFI: Imunofluorescência Indireta

IFN-γ: Interferon Gama

IG : Imunoglobulinas

IL: Interleucina

IL-2r: Receptor de Interleucina 2

ILC: Células linfoides inatas (do inglês: innate lymphoid cells)

iNOS: Óxido Nítrico Sintetase Induzível (do inglês: Inducible nitric oxide synthase)

ITS- Espaçador Interno Transcrito (Do inglês: Internal transcribed spacer)

kDNA: DNA do Cinetoplasto(do inglês: kinetoplast DNA)

LAG3- Gene de Ativação de Linfócito 3

LB: Linfócitos B

LC: Leishmaniose Cutânea

LCA: Leishmaniose cutânea atípica

LCD: Leishmaniose Cutâneo Difusa

LCI: Leishmaniose Cutânea Intermediária

LD: Leishmaniose Cutânea Disseminada

LDT= limite de detecção

LM: Leishmaniose mucosa

LR: Leishmaniose recidiva cútis

LDPC: Leishmaniose dérmica pós calazar

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)

LIT: do inglês “Liver Infusion Triptose”

LM: Leishmaniose Mucosa

LM: Leishmaniose Mucosa

LPG: Lipofosfoglicana (do inglês lipophosphoglycan)

LT: Linfócito T

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LV: Leishmaniose Visceral

LVR1: Leishmania Vírus 1

MHOM/BR/PH8: Cepas de referência e outras sobre as quais a informação é publicada ou disseminada são rotulados por um código de quatro elementos (código OMS), indicando (1) o hospedeiro do qual a cepa foi isolada, (2) o país em que a infecção

foi adquirido (se conhecido com certeza), (3) o ano de isolamento e (4) a primeira designação de laboratório do isolado, que deve permanecer uma parte do código e não pode ser substituído por um número de banco criogênico. As listas de códigos utilizados estão no manual de controle da Leishmaniose da OMS. No caso hospedeiro(C- classe; SSS – espécie)/país/nome da cepa. M- sendo a classe de hospedeiro mamífero, HOM- Homo sapiens, BR- Brasil, PH8- Nome da sepa.

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)

NAP- Núcleo de Apoio à Pesquisa

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)

NLR: receptores NOD-like (do inglês Nod Like receptors).

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

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês: pathogen associated molecular patterns)

pb: Pares de bases

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)

PPGs: Proteofosfoglicanas (do inglês: proteophosphoglycan)

PRR= receptores de padrão(do inglês: pattern-recognition receptors)

PWM: Mitogêno de Pokeweed

PR: razão de prevalências (do inglês: prevalece ratios)

QT: Quantitativo

RNA: Ácido Ribonucleico(do inglês: Ribonucleic acid)

RIG-I: genes indutores de ácido retinóico – I (do inglês- Retinoic acid-inducible gene I)

RFLP = Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (do inglês: Restriction Fragment Length Polymorphism)

RPMI (Roswell Park Memorial Institute)

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês: reactive oxygen species)

rDNA: DNA ribossômico (do inglês: Ribosomal Deoxyribonucleic acid)

rRNA: RNA do ribossomo (do inglês: Ribosomal ribonucleic acid)

RUO: uso limitado a pesquisa (do inglês: research use only)

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

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

TAMRA- carboxitetrametilrodamina

TGO - Transaminase Glutâmico Oxalacética

TGP -Transaminase Glutâmico Pirúvica

Taq- Thermus aquaticus

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

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

TLR: ReceptoresTipo Toll (Do inglês: toll like receptor)

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral (Do inglês tumor necrosis fator)

Treg: Células T Regulatórias

UNESCO: Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (Do inglês: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization)

KO: Knock out

VIF: fator de inflação da variância (do inglês: variance inflation fator)

WT: Alelo Selvagem

TX: Texas

SUMÁRIO

PREÂMBULO.....	24
CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO GERAL	25
1.1 HISTÓRICO.....	26
1.2 SITUAÇÃO ATUAL.....	31
1.3 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	40
1.3.1 Apresentação clínica	41
1.3.1.1 Leishmaniose cutânea localizada-(LC).....	41
1.3.1.2 Leshmaniose Cutânea Disseminada- (LD).....	42
1.3.1.3 Leishmaniose Cutâneo Difusa.....	44
1.3.1.4 Formas atípicas	46
1.3.1.5 Leishmaniose Mucosa- LM.....	54
1.3.2 Diagnóstico Laboratorial	59
1.3.2.1 Reação intradérmica de Montenegro (IDRM).....	59
1.3.2.2 Testes sorológicos	62
1.3.2.3 Exame direto.....	64
1.3.2.4 Cultura 65	
1.3.2.5 Técnicas moleculares	66
1.3.2.5.1 Coleta do material.....	66
1.3.2.5.1 Preparação do Ácido Nucleico.....	67
1.3.2.5.2 Amplificação e Análise	69
1.3.2.5.3 Sondas e Primers utilizados.....	74
1.3.2.6 Histopatologia	75
1.4 A RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO E O DESENVOLVIMENTO DA FORMA MUCOSA.....	78
CAPÍTULO 2 – ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE ANTÍGENO DE LEISHMANIA PREPARADO NA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.....	80
2.1 INTRODUÇÃO	81
2.2 OBJETIVOS	81
3.1.1 Objetivo geral:.....	81
3.1.2 Objetivos específicos	81

2.3 MÉTODOS	82
2.3.1 Tipo de estudo e local	82
2.3.2 Amostra	82
2.3.3 Intervenção e divisão dos grupos	82
2.3.4 Preparo de antígeno de <i>L. (L.) amazonensis</i> MHOM/BR/PH8	83
2.3.5 Aplicação do antígeno nos camundongos	83
2.3.6 Observação das reações na pele após 48h	84
2.3.7 Coleta de amostras	84
2.3.8 Exames bioquímicos	84
2.3.9 Cultura de leishmania	85
2.3.10 Exame Histopatológico	85
2.3.11 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	85
2.3.11 Princípios Éticos	86
2.3.12 Análises estatísticas	86
2.4 RESULTADOS	87
2.4.1 Observação do local de inoculação do ALA	87
2.4.2 Exames bioquímicos para estudo dos efeitos adversos	87
2.4.3 Aspirado da lesão e cultura	88
2.4.4 Exame histopatológico	88
2.4.4 PCR	92
2.5 DISCUSSÃO	92
2.6 CONCLUSÕES	96
2.6.1 Geral	96
2.6.2 Específicas	96
CAPÍTULO 3 A PRESENÇA DE DNA DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> NA MUCOSA NASAL DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA E A BUSCA DE POSSÍVEIS PADRÕES CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS DE PROGRESSÃO DA DOENÇA: UM ESTUDO TRANSVERSAL	98
3.1. INTRODUÇÃO	99
3.1.1 A disseminação da <i>Leishmania</i> para a mucosa nasal	99
3.1.2 A Imunopatogênese da Leishmaniose mucosa	101
3.1.2.1 Resposta imune inata.	101
3.1.2.2 A via do complemento	102

3.1.2.3 Os receptores reconhecedores de padrão	105
3.1.2.4 O estabelecimento do parasito no meio intracelular	106
3.1.2.5 Estabelecimento no hospedeiro e os modelos da resposta Imune Adaptativa	107
3.1.3 Os métodos para estudo da resposta imunológica.....	110
3.1.4 Fatores de confusão.....	112
3.1.4.1 A utilização do desfecho substituto	114
3.2 OBJETIVOS	115
3.2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO:	115
3.2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS:	115
3.3. MÉTODOS	115
3.3.1 CARACTERÍSTICA DO ESTUDO	115
3.3.2 LOCAL DO ESTUDO	116
3.3.3 POPULAÇÃO ESTUDADA E DEFINIÇÃO DE CASO	116
3.3.4 EXAMES DIAGNÓSTICOS PARA CONFIRMAÇÃO DE LTA	117
3.3.5 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS	117
3.3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	118
3.3.6.1 Cálculo Amostral	118
3.3.6.2 Análise dos dados	118
3.4 RESULTADOS	119
3.4.1 Características básicas da população	119
3.4.2 Resultado da análise univariada	121
3.4.3 Resultado da análise multivariada	122
3.5. DISCUSSÃO	122
3.5.1 As citocinas estudadas e a indução da resposta imune adaptativa	122
3.5.2 O desfecho utilizado.....	125
3.5.3 A dosagem de citocinas séricas	129
3.5.4 Disseminação da Leishmania para a mucosa nasal.....	131
3.6 CONCLUSÕES	133
CAPÍTULO 4 – MORFOLOGIA DA LESÃO COMO POSSÍVEL PREDITOR CLÍNICO DA DISSEMINAÇÃO DA LEISHMANIA PARA A MUCOSA NASAL: UM ESTUDO TRANSVERSAL.....	134
4.1 INTRODUÇÃO	135

4.2 OBJETIVO.....	135
4.3 MÉTODOS	135
4.3.1 Características do estudo	135
4.3.2 Local do estudo	136
4.3.3 População estudada, definição de caso e cálculo amostral.....	136
4.3.4 Exames diagnósticos para confirmação de LTA	137
4.3.5 Coleta de dados clínicos e laboratoriais	138
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA E RESULTADOS.....	140
4.5 DISCUSSÃO	143
4.6 CONCLUSÃO.....	145
5. REFERÊNCIAS	146
6.APÊNDICE	169
6.1 APÊNDICE I- APROVAÇÃO DO COMITÉ DE ÉTICA	169
6.2 APÊNDICE II TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	173
6.3 APÊNDICE III- FICHA OTORRINOLARINGOLÓGICA DE LTA.....	174
6.4 APÊNDICE IV FICHA DERMATOLÓGICA DE LTA	175
6.5 APÊNDICE V- ARTIGOS PUBLICADOS POR ORIENTADORA E ESTUDANTE NO PERÍODO	178

PREÂMBULO

Esta tese é composta por quatro capítulos. A introdução (Capítulo 1) apresenta informações gerais sobre a importância e histórico da leishmaniose mucosa assim como assuntos relevantes a todos os capítulos. Uma contextualização de temas mais relevantes a cada capítulo estará presente em sua respectiva introdução. Com o objetivo de entender os fatores clínicos e imunológicos responsáveis pelo desenvolvimento da Leishmaniose mucosa desenvolvemos estudos transversais tendo como desfecho primário a disseminação da *L. (V.) braziliensis* para a mucosa nasal. Devido a mudanças na disponibilidade da IDRМ no período do estudo e anteendo dificuldades no diagnóstico dos pacientes, necessário para inclusão no estudo, também realizamos testes em animais com vistas à validação de antígeno derivado de *L. (L.) amazonensis* produzido na Universidade de Brasília- Capítulo 2. O trabalho principal- Capítulo 3- procurou desenvolver modelo dos fatores imunológicos relacionados a LM. Entendendo a importância de se buscar fatores clínicos capazes de guiar prática médica diária foi realizado também estudo de possíveis fatores relacionados à morfologia da lesão que pudessem prever o desenvolvimento de LM- Capítulo 4.

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1 HISTÓRICO

A primeira evidencia fóssil de possíveis ancestrais de leishmania é do período Cretáceo a aproximadamente 100 milhões de anos atrás, sendo esta derivada de uma fêmea de mosquito palha preservada em âmbar que foi encontrada em Burma (1, 2). Os hospedeiros iniciais da *Leishmania spp* podem ter sido répteis (3). Em mamíferos evidências fósseis da presença conjunta do vetor e do reservatório sugerem que a Leishmaniose em tenha se originado durante o período Paleoceno (65-31 milhões de anos atrás)(3). A Leishmaniose humana deve estar relacionada a própria origem e evolução do homem na África (3, 4). Testes moleculares apontam para a existência de Leishmaniose em múmias egípcias com aproximadamente 4000 anos de idade (5). Na América Latina a Leishmaniose provavelmente estava presente no período pré-colonial já que estudo paleopatológico mostrou sinais indicativos de LM em crânios do sítio arqueológico de Makat-Tampu no Peru(6)(Figura 1). A forma mucosa na região pode ser ainda mais precoce, já que esculturas em cerâmica mochica dos séculos I a VII D.C exibem lesões sugestivas de Leishmaniose Mucosa(LM) (Figura 2) (6).

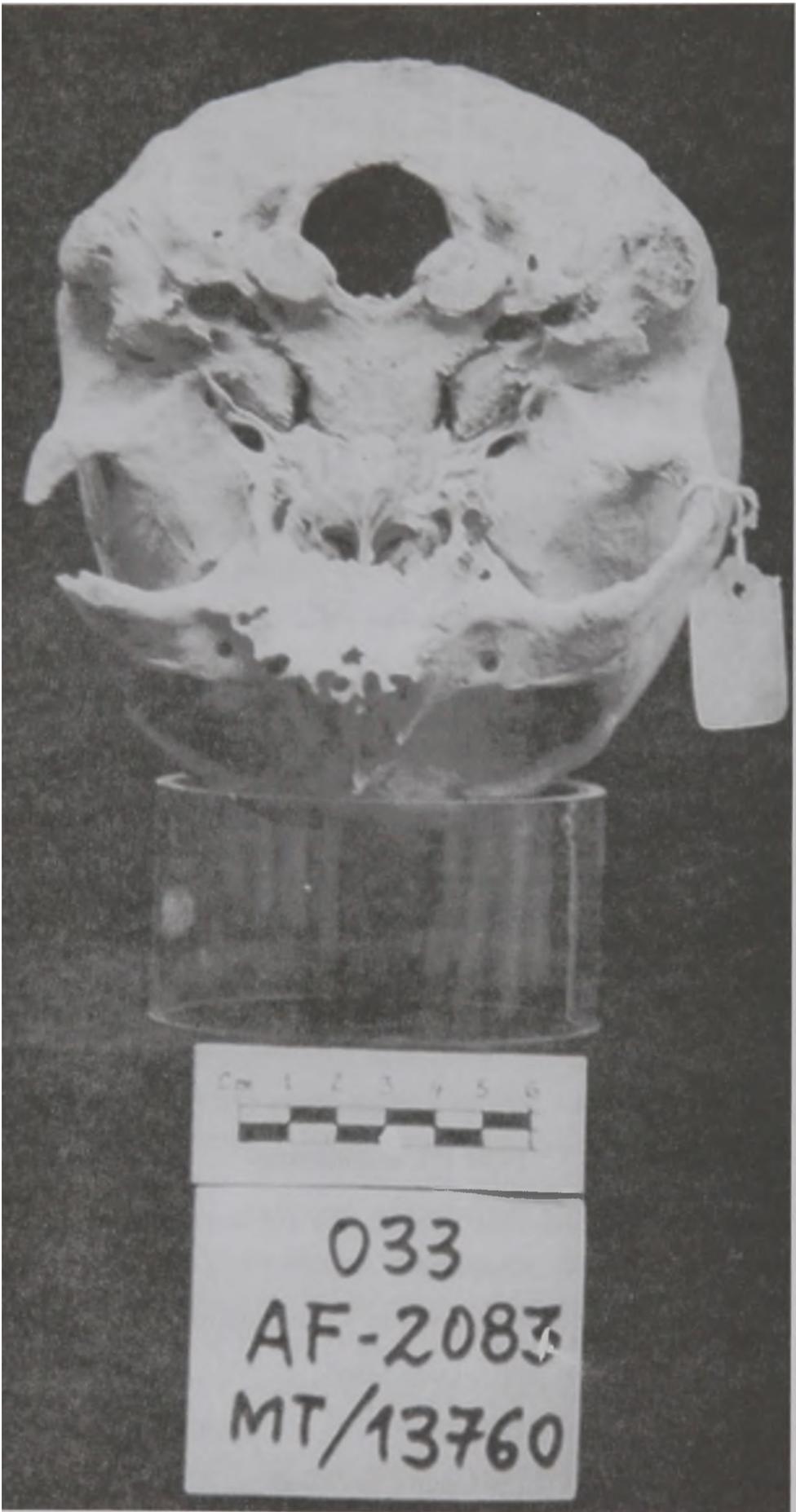


Figura 1: Crânio encontrado no Sítio arqueológico de Makat-Tampu: Trata se de crânio de um Homem de aproximadamente 35-45 anos de idade com lesão lítica em osso palatino formando uma curvatura suave e bordos arredondados e ondulantes que contorna o osso e exibe sinais de neovascularização. Observa-se ainda a ausência de cornetos nasais. Foi observada ainda fratura de espinha nasal anterior incluindo a destruição parcial do maxilar sem reação periosteal. A borda da lesão é arredondada reta e fina-adaptado de ALTAMIRANO-ENCISO 2001(6).



Figura 2: **A:** Peça “Figura antropomórfica sentada: representação do doente” (Fotografo: Martin Franke) **B:** Peça “Apresentação do doente: Leishmaniose”(Fotógrafa: Sandra Steiß). Ambas estão no Museu Etnológico de Berlin. As peças são da cultura Mocha 0-600 D.C e representam cabeça antropomórfica com bico na parte de trás e mostram lábios e nariz deformados por conta da doença. Wilhelm Gretzer (1847 - 1926) © Foto: Museu Etnológico dos Museus do Estado de Berlim - Patrimônio Cultural Prussiano. A- URL: <http://www.smb-digital.de/eMuseumPlus?service=ExternalInterface&module=collection&objectId=44921&viewType=detailView> B- URL:<http://www.smb-digital.de/eMuseumPlus?service=ExternalInterface&module=collection&objectId=2939&viewType=detailView>.

O agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana(LTA), chamada então “ferida de Deli”, foi primeiramente descrito como tal em 1903 por Wrigth(7). No Brasil o agente etiológico da LTA , à época denominada úlcera de Bauru, foi quase

que simultaneamente identificado por Lindenberg e por Carini & Paranhos em 1909(8). Rabello afirma que é possível afirmar, entretanto, que existe Leishmaniose documentada no Brasil pelo menos desde 1827(9). Evidência de infecção ainda mais precoce por espécie *Leishmania* símile foi encontrada em cadáver mumificado com aproximadamente 300 anos em Minas Gerais(10).

A ciência brasileira teve importância central na luta contra a LTA tanto no tratamento, com a descoberta do tártaro emético por Gaspar Vianna em 1911(8), como no diagnóstico, com a descrição por Montenegro em 1926 da “reação cutânea ao extrato de *Leishmania*”(11)(Figura 3). Esta reação, que passou a ser chamada de intradermorreação de Montenegro (IDRM), avalia a resposta de hipersensibilidade retardada ao antígeno de *Leishmania* e tem fundamental importância, até os dias de hoje. Por ser de fácil aplicação, o teste é de extrema importância nos locais onde não há disponibilidade de teste molecular, além de auxiliar no diagnóstico de pacientes com PCR negativo e(12, 13) .

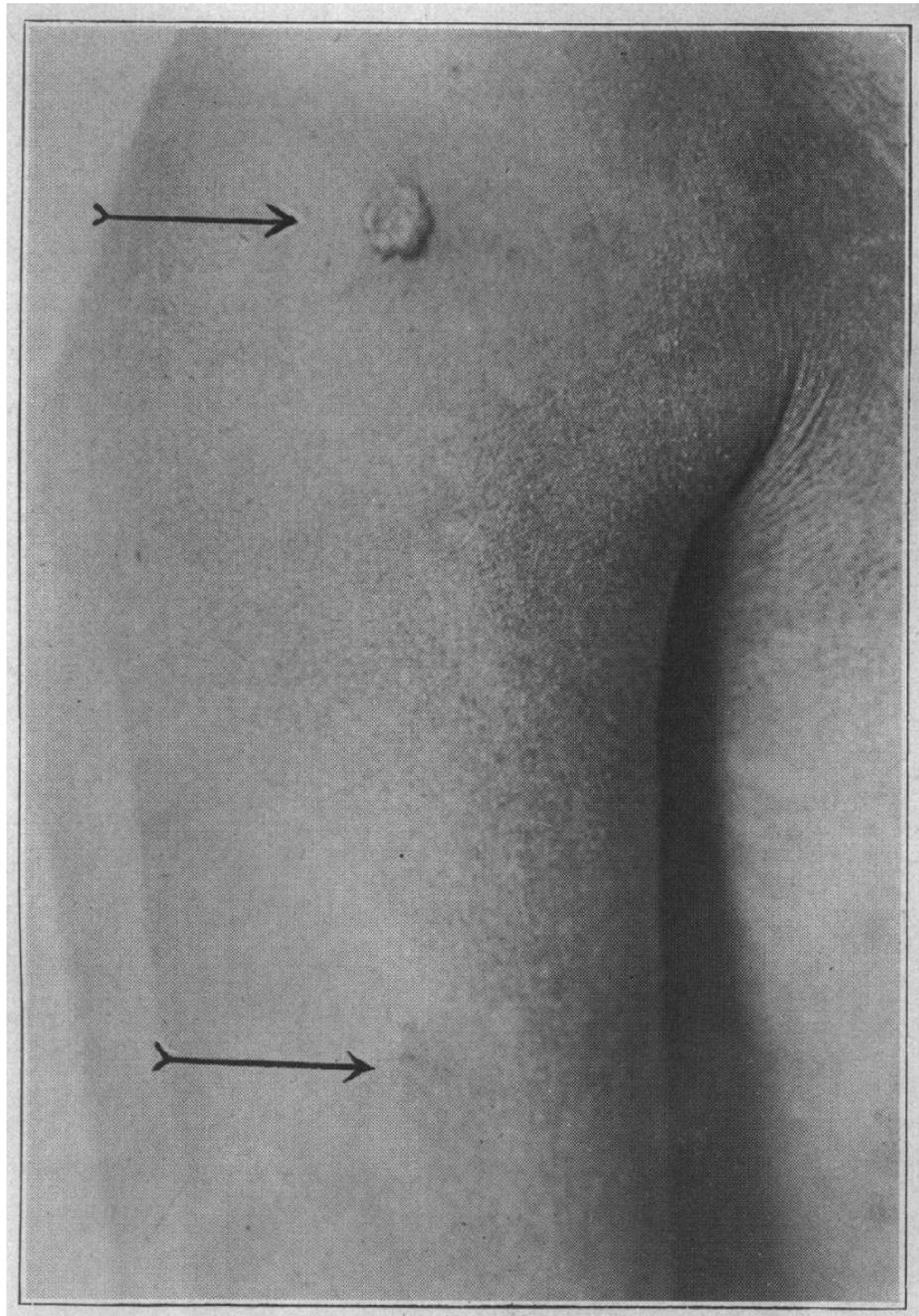


Fig. 1.—Vesicle formation skin reaction to Leishmania extract.

Figura 3- Ilustração presente no artigo de Montenegro de 1926, no qual o autor descreve a formação de vesícula, após reação ao extrato de Leishmania- Montenegro 1926-(11).

1.2 SITUAÇÃO ATUAL

A Leishmaniose é um importante problema de saúde 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)(14, 15). 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(16). 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(16). A figura 4 mostra o estado da endemicidade na LC a nível mundial em 2018, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS).

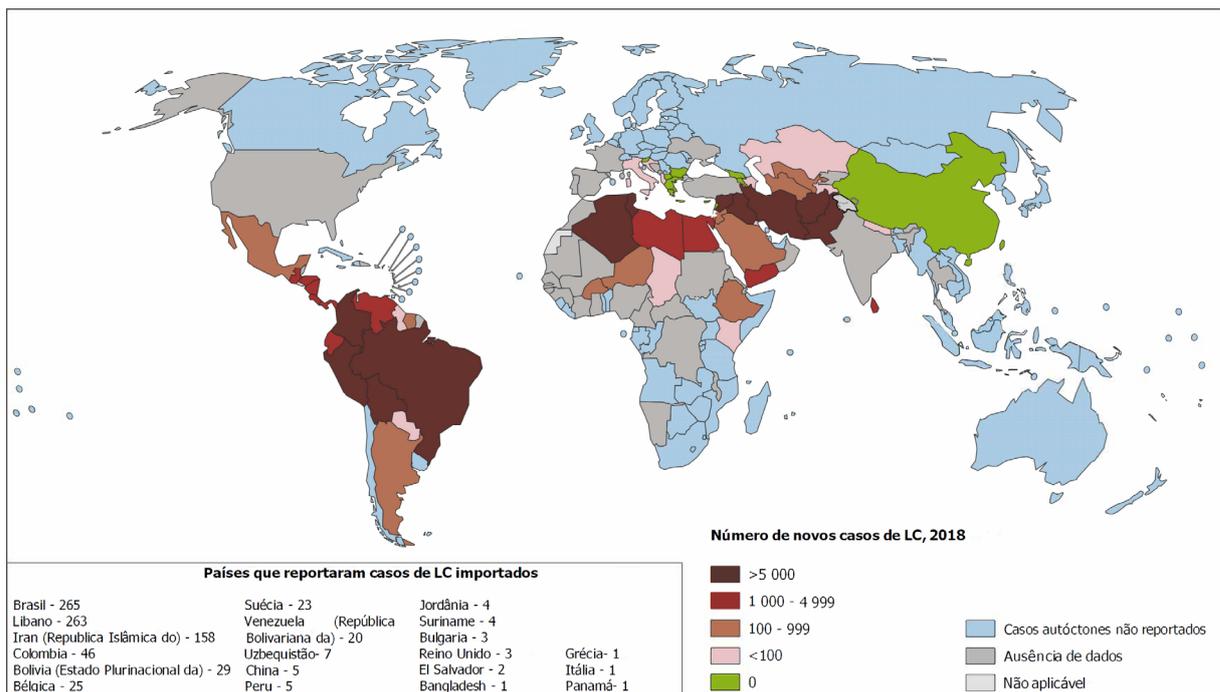


Figura 4: Estado da endemicidade de LC no mundo em 2018 segundo a OMS-(adaptado de: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 24 abril. 2021).

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(17). O Impacto negativo das sequelas da LTA é possivelmente subestimado pela sua associação com desordens psiquiátricas(18, 19). Além da possibilidade de levar à morte tanto na forma visceral como na forma tegumentar(14, 20), a LTA pode evoluir para a cronicidade e levar à deformidades, principalmente na LM e na Leishmaniose Difusa (LCD)(21-23). Estudo realizado por Costa e cols mostrou que 73.3% dos pacientes com Leishmaniose Mucosa (LM) se sentem marginalizados e 96% das pessoas da comunidade onde estes pacientes vivem acham que os mesmos tem problemas de relacionamento social(24).

Outro aspecto desafiador da Leishmaniose é complexidade clínica e epidemiológica, sendo uma mesma espécie pode causar diversas formas clínicas da doença, como demonstrado no Quadro I (Adaptada de Burza e cols.)(25)

	Sub gênero	Formas clínicas	Principais características clínicas	Progressão natural	Grupos de Risco	Principais reservatórios	Países de alta carga da doença	Indicência global estimada
<i>L. donovani</i> *	Leishmania	LV e LDPC	Febre persistente, Esplenomegalia, perda de peso, anemia na LV, múltiplas lesões papulares maculares ou nodulares em LDPC	LV é fatal em dois anos; Lesões de LDPC tem cura espontânea em até 85% dos casos na África, mas raramente na Ásia.	Predominantemente adolescentes e adultos jovens para a LV; Crianças jovens no Sudão e sem fatores de risco claramente estabelecidos para LDPC.	Humanos	Índia, Bangladesh, Etiópia, Sudão, e Sudão do Sul	50 000–90 000 casos de LV; número desconhecido de casos de LDPC
<i>L. tropica</i> *	Leishmania	LC, LR e raramente LV	Lesões ulceradas "secas", indolores, e frequentemente múltiplas	Lesões cutâneas geralmente tem cura espontânea em 1 ano	Sem grupos de risco claramente definidos	Humanos, mas focos zoonóticos também existem	Leste do mediterrâneo, oriente médio, nordeste e sudeste da África.	200 000–400 000 de LC
<i>L. aethiopica</i> *	Leishmania	LC, LD, LCD e LC oronasal	Lesões cutâneas nodulares, ocasionalmente oronasais; raramente ulceram	cura espontânea em 2 a 5 anos, exceto LCD	Evidências limitadas, adolescentes	Hiracoides	Etiópia and Kenia	20 000–40 000 LC

<i>L. major</i> *	Leishmania	LC	Necrose rápida, múltipla feridas “úmidas” e com severa inflamação	Cura espontânea em > 50% dos casos dentro 2–8 meses; múltiplas lesões que demoram a cicatrizar, Leva a cicatrizes graves	Sem grupos de risco claramente definidos	Roedores	Irã, Arábia Saudita, norte da África, o Oriente Médio, Ásia central, e África Ocidental	230 000–430 000 LC
<i>L. infantum</i> *	Leishmania	LC e LV	Febre persistente e esplenomegalia em LV; LC tipicamente leva a nódulos únicos com inflamação mínima	LV é fatal dentro de 2 anos; Lesões de LC tem cura espontânea dentro de 1 ano conferindo imunidade permanente	Crianças menores de 5 anos e adultos imunocomprometidos na LV; crianças mais velhas e jovens adultos para LC	Cães, lebres, e humanos	China, sul da Europa, Brasil e América do Sul para LV e LC; América Central para LC	6200-12.000 casos de LV do velho mundo e 4500-6800 casos de LV do novo mundo; número desconhecido de casos de LC
<i>L. mexicana</i> †	Leishmania	LC, LCD e LD	Lesões ulcerativas, únicas ou múltiplas	Cura espontânea em 3 a 4 meses	Sem grupos de risco claramente definidos	Roedores e marsupiais	América do Sul	Número limitado de casos, incluídos no total de 187 200-300 000 casos de LC do Novo Mundo ‡

<i>L. amazonensis</i> †	Leishmania	LC, LCD e LD	Lesões ulcerativas, únicas ou múltiplas	Não bem descrita	Sem grupos de risco claramente definidos	Gambás e roedores	América do Sul	Número limitado de casos, incluídos no total de 187 200-300 000 casos de LC do Novo Mundo ‡
<i>L. braziliensis</i> †	<i>Viannia</i>	LC, LM, LD, e LR	Lesões ulcerativas podem progredir para mucocutâneas; linfonodos locais são palpável antes e no início no início das lesões	Pode ter cura espontânea dentro 6 meses; 2 a 5% dos casos progridem para LM	Sem grupos de risco claramente definidos	Cães, humanos, roedores e cavalos	América do Sul	A maioria do total de 187 200-300 000 casos de LC do Novo Mundo ‡
<i>L. guyanensis</i> †	<i>Viannia</i>	LC, LD e LM	Lesões ulcerativas, únicas ou múltipla que pode progredir para a forma mucocutânea; linfonodos palpáveis.	Pode ter cura espontânea dentro 6 meses	Sem grupos de risco claramente definidos	Gambás, preguiças e tamanduás	América do Sul	Número limitado de casos, incluídos no total de 187 200-300 000 casos de LC do Novo Mundo ‡

LV = Leishmaniose visceral. PDPC = Leishmaniose dérmica pós-calazar. LC = Leishmaniose cutânea. LR = Leishmaniose recidiva cutis. LCD = Leishmaniose cutânea difusa. LD = Leishmaniose cutânea disseminada. LM = Leishmaniose mucocutânea. * Leishmaniose do Velho Mundo. † = Leishmaniose do Novo Mundo. ‡ As estimativas são de todas as Leishmanioses do Novo Mundo, com *Leishmania (V.) braziliensis* compreendendo a grande maioria desses casos.

Quadro 1- Características clínicas e epidemiológicas das espécies de *Leishmania*, adaptado de Burza e cols(25).

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(Figura 5)(26). 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(16), como pode ser observado na figura 3 - Adaptado de Aronson e cols.(27). Na região de Brasília, entretanto, 90% dos casos de LTA são causados por *L. (V.) braziliensis* (28). O acometimento mucoso também tem grande associação com a *L. (V.) braziliensis*, mas casos causados por outras espécies já foram relatados(29-32).

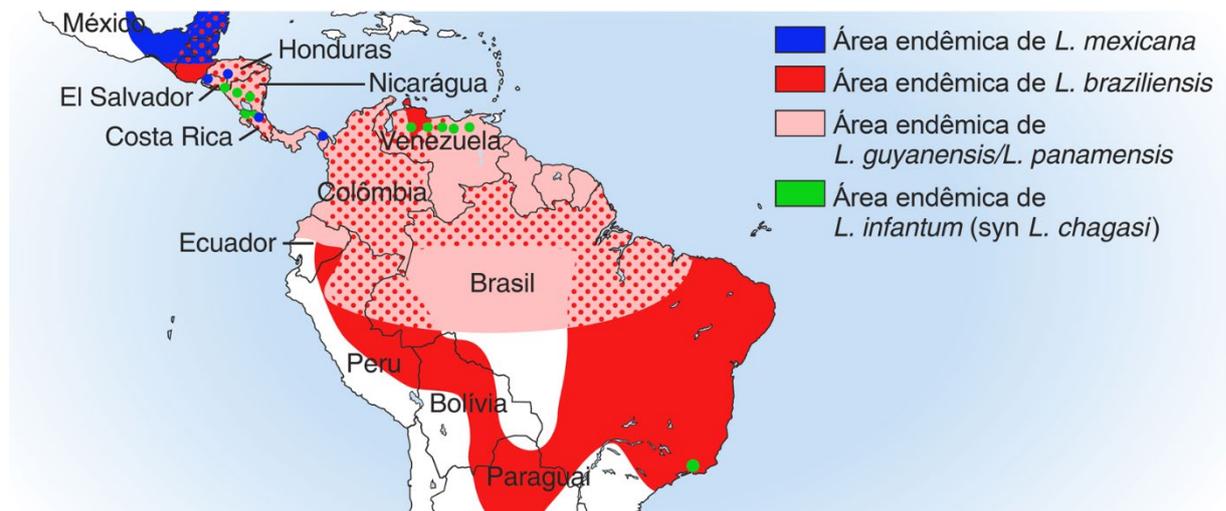


Figura 5- Mapas da distribuição geográfica da Leishmaniose tegumentar na América Latina - Fonte – referência (27).

A LTA se encontra entre as grandes endemias existentes no Brasil e na América Latina(26). 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(33-47). Esta doença classicamente é uma zoonose de animais silvestres e que ocasionalmente infecta seres humanos principalmente homens adultos e lavradores. A partir do final do século passado houve mudança do padrão epidemiológico com aparecimento de um segundo padrão com aumento de acometimento de mulheres, de faixas etárias mais homogêneas, de profissões não relacionadas as atividades de mata e procedentes de regiões metropolitanas(48). Esta mudança é relacionada à transmissão domiciliar da doença sendo que o principal vetor da LTA no DF é mais frequentemente encontrado no peridomicílio(48, 49).

O padrão de transmissão antroponótica da LC tem importância no velho mundo(50). Na LTA, por outro lado, o papel do ser humano como reservatório em caso de surtos de Leishmaniose por *L. (V.) braziliensis* já foi levantado no último manual da OMS(51). Segundo Schriefer e cols, entretanto, ciclos antroponóticos não são considerados importantes na LTA, exceto por alguns relatos de que este modo de transmissão ocorre com *L. (L.) infantum chagasi* em grandes áreas urbanas no nordeste do Brasil(52, 53). A figura 6 mostra a densidade de incidência de LTA no Brasil em 2019 (54).

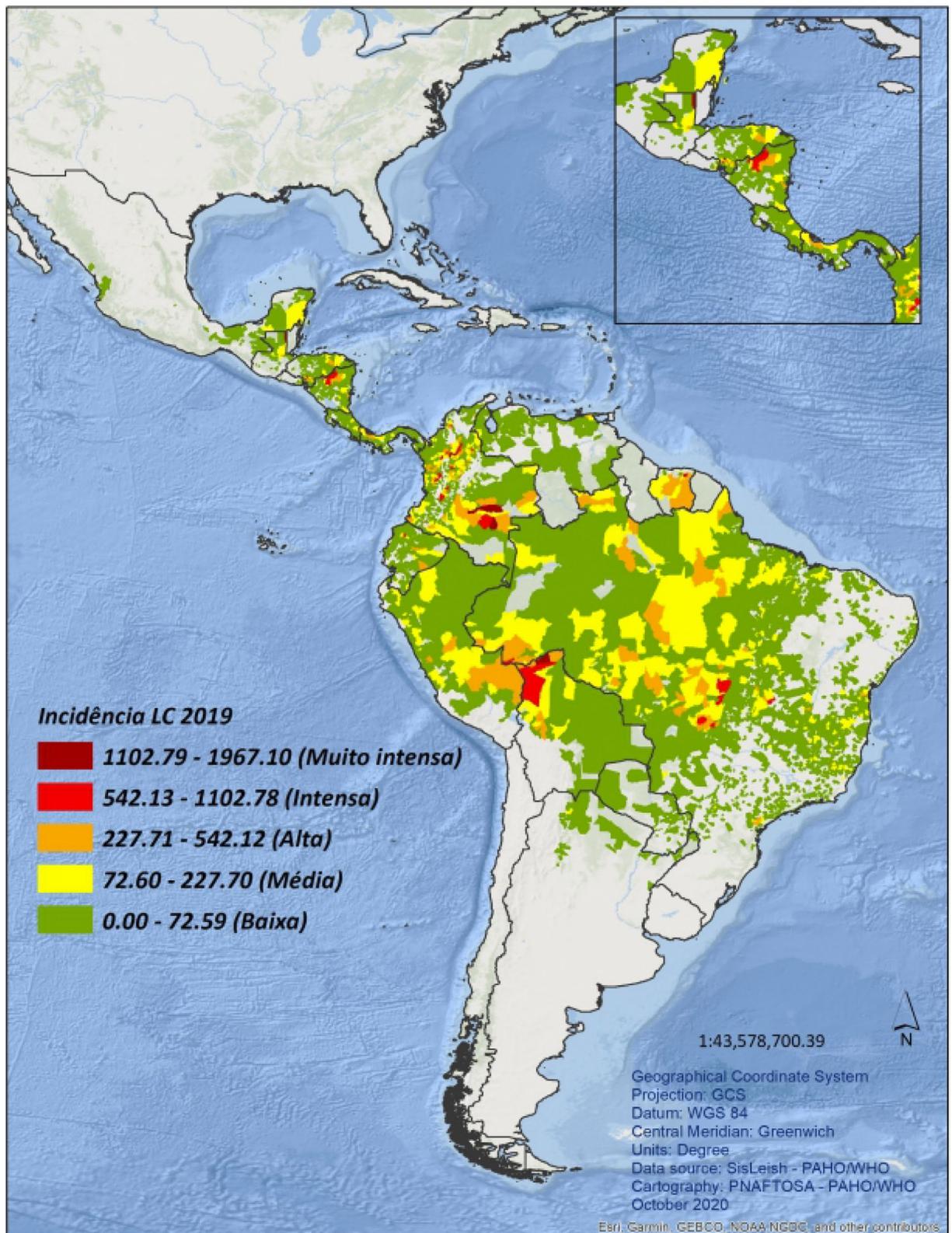


Figura 6- Incidência de Leishmaniose cutânea/mucosa por 100.000 habitantes, segundo nível administrativo subnacional, Região das Américas, 2019- Adaptado de ref(54) disponível em <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>.

O vetor da Leishmaniose cutânea é o flebótomo, sendo que nas Américas várias espécies estão envolvidas, entre elas: *Lu. intermedia*; *Lu. gomezi*; *Lu. wellcomei*; *Lu. whitmani*; *Lu. carrerai*; *Lu. yucumensis*; *Lu. llanosmartinsi*; *Lu. spinicrassa*; *Lu. ovallesi*; *Lu. rapidoi*; *Lu. gomezi*; *Lu. ylephiletor*; *Lu. panamensis*; *Lu. umbratilis*; *Lu. whitmani*; *Lu. anduzei*; *Lu. longiflocosa*; *Lu. ayacuchensis*; *Lu. peruensis*; *Lu. verrucarum*; e *Lu. flaviscutellata*(55). Na região de Brasília o principal vetor incriminado na transmissão da LTA e a *Lu whitmani* sendo a *Lu davisii* também possivelmente implicada(56).

A diversidade de hospedeiros é mais um fator da complexidade epidemiológica da Leishmaniose que, além do homem, tem sido descrita em uma variedade de insetos, canídeos e outros mamíferos(figura 7)(57). No padrão de transmissão clássico animais silvestres seriam os responsáveis e, mais recentemente, o cão doméstico tem sido relatado como importante (51).

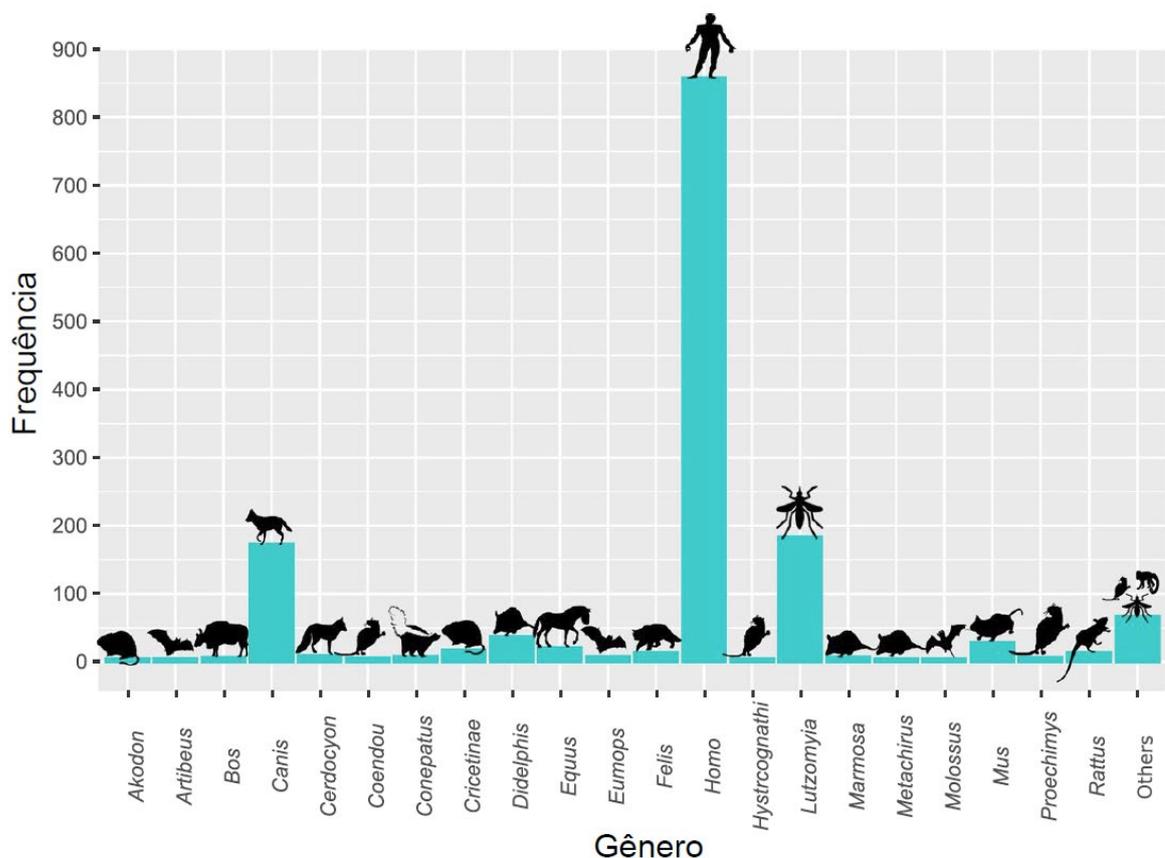


Figura 7- Frequência de relatos de Infecção por *Leishmania spp.* por hospedeiro nas américas- adaptado da referência (57)

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(58). A confirmação parasitológica da doença nem sempre é possível já os testes comumente disponíveis tem baixa sensibilidade(13) e mesmo testes de biologia molecular são eventualmente negativos na LTA(12). Neste sentido a 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(26).

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 infecção por *Leishmania spp.* pode levar a um grande número de manifestações tegumentares dependendo de fatores como a espécie de *Leishmania* envolvida, o número de parasitos inoculados, local do inóculo e estado nutricional e imunitário do indivíduo(59).

Não existe consenso quando a classificação da LTA, na última edição do Manual de Organização Mundial de Saúde, a Leishmaniose cutânea do novo mundo em imunocompetentes é dividida em: 1- Leishmaniose cutânea localizada(LC); 2- Leishmaniose mucocutânea(LM); 3- Leishmaniose cutânea difusa(LCD); 4- Leishmaniose cutânea disseminada(LD); e 5- Leishmaniose cutânea atípica(LCA) (60).

A Leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) é uma forma que ocorre no sul da Ásia e no leste da África durante ou após um episódio de Leishmaniose visceral causada por *L. (L.) donovani* (51, 61). Apresentação clínica semelhante também tem sido descrita em pacientes infectados com *L. (L.) infantum chagasi* com imunodepressão associada a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ou após transplante de órgãos(62-64). Lesões mucosas também podem ocorrer na LDPC com acometimento da língua, mucosa oral e palato mole(63, 65).

Apresentaremos a seguir as formas clínicas de acordo com a classificação da OMS para pacientes imunocompetentes(51).

1.3.1.1 Leishmaniose cutânea localizada-(LC)

Forma mais comum da doença, a LC é caracterizada por úlcera indolor de formato arredondado ou ovalado, base eritematosa e com consistência firme,

apresenta bordas bem delimitadas e elevadas com fundo avermelhado e granulações grosseiras(Figura 8)(26, 66, 67). A área média da lesão é de 30mm² e tem com evolução aproximadamente de 30 dias, embora o tamanho da lesão seja influenciado pelo tempo de evolução(68).

Uma característica muito importante é a linfadenopatia que ocorre em 80-100% dos casos(69, 70). Este sinal, entretanto, tende a variar de acordo com a espécie sendo mais frequente na LC causada por *L. (V.) braziliensis* (94.5% dos casos) que na causada por *L. (V.) guyanensis*(71). Ao contrário da úlcera, a linfadenopatia é dolorosa em 59% dos casos e pode surgir em até 3 meses após o início da doença(70). O paciente típico é do sexo masculino, agricultor e com uma mediana de 21 anos de idade(68). O teste com o antígeno de Montenegro é positivo em 83-90% dos casos(72-75).



Figura 8- Úlcera de bordas elevadas típica de Leishmaniose- Fonte: Arquivo pessoal.

1.3.1.2 Leshmaniose Cutânea Disseminada- (LD)

É causada principalmente pela *Leishmania (V.) braziliensis*, mas pode também ser causada pela *L. (L.) amazonensis*, pela *Leishmania (V.) guyanensis* (76) e pela *Leishmania (V.) panamensis*(77, 78). Caracteriza-se pelo aparecimento de 10 ou mais lesões em áreas não contínuas do corpo, podendo ser entre outras papulares, nodulares, acneiformes ou ulceradas(Figura 9) (79, 80). Tipicamente os pacientes

apresentam lesões primárias caracterizadas por úlcera de morfologia semelhante a LC e posteriormente desenvolvem pápulas secundárias. Estas lesões acneiformes secundárias tem características histopatológicas distintas das primárias, apresentando infiltrado inflamatório menos intenso e de distribuição folicular(81, 82).

O rápido surgimento de lesões secundarias (83) associada a presença frequente de sintomas sistêmicos como febre, calafrios e astenia (84) sugerem que a disseminação na LD é predominantemente hematogênica(83). Esta disseminação pode explicar a alta prevalência de acometimento mucoso em pacientes com LD, de 28-44% dos casos(79, 83, 85, 86).

Na LD a reação de Montenegro pode ser positiva ou negativa(84). Apesar de alguns autores referirem que a intradermoreação de Montenegro (IDRM) é fortemente positiva nesta forma da doença(87), sua positividade varia entre 58,8% e 85% em diferentes estudos(78, 80, 85, 86) e em um estudo o diâmetro da reação tendeu a ser menor nesta forma que na forma cutânea localizada(88). A reação intradérmica de Montenegro, entretanto, tende a se tornar positiva após o tratamento(80), positividade que chega a 100% em algumas séries de casos(84).



Figura 9- Leishmaniose disseminada em paciente envolvendo tronco e membros- Fonte- arquivo pessoal

1.3.1.3 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 Hansenóide; Leishmaniose tegumentar generalizada, com Lepromas Leishmanióticos; Leishmaniose disseminada de aspecto Lepromatoso; Leishmaniose tegumentar simulando Lepra; Leishmaniose cutânea pseudo-Lepromatosa; Leishmaniose lepromatosa; Leishmaniose anergo-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(89).

Nas Américas a LCD é causada pela *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*(87), embora já tenham sido reportados casos por outras espécies como: *L. (L.) waltoni*(90), *L. (V.) panamensis*(91) e *L. (V.) braziliensis*(92). A LCD foi inicialmente definida em 1962 por Convit(93), após uma série de casos de Leishmaniose atípica que foram descritos a partir de 1948(94, 95). No trabalho original as seguintes características estão presentes na LCD que permitem sua diferenciação com a LC(93):

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(Figura 10), que podem com o tempo atingir grandes áreas da pele, é constante na literatura(89, 96-98). 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%(99). A LCD também pode levar a acometimento mucoso e este tem frequência aproximada entre um terço e metade dos pacientes a depender

do estudo(99-101). A lesão mucosa da LCD é geralmente superficial(100), mas já tenham sido descritos casos de perfuração de septo nasal(99, 102).

Esta forma da Leishmaniose está caracteristicamente associada a negatividade da IDRM, que ocorre em 100% dos pacientes(73, 103). 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(99).



Figura 10- Placas, nódulos e pápulas não ulceradas em paciente com Leishmaniose difusa. Fonte arquivo pessoal.

1.3.1.4 Formas atípicas

Não existe definição de forma atípica nesta referência, mas a morfologia típica seria uma lesão crateriforme arredondada ou ovalada. Segundo Guimarães e cols a Leishmaniose atípica seria a que não fosse classificada em nenhuma das quatro formas classicamente descritas(LC, LM, LCD e LD)(104). Segundo Meireles e cols em recente metanálise a forma atípica da LC poderia incluir as seguintes apresentações: úlcera vulcânica eritematosa, lupóide, eczematosa, erisipelóide, verrucosa, seca, zosteriforme, paroniquiana, esporotricóide, cancriforme e anular(105). A grande variedade de apresentações clínicas da LTA pode levar a atraso no diagnóstico e piorar o prognóstico destes pacientes(106). Desta forma, a Leishmaniose pode levar pode fazer parte do diagnóstico diferencial de uma grande gama de condições clínicas(Tabela 1 e Figuras 11 a 17)(107). A variação clínica pode estar relacionada a variações antigênicas dos parasitos, sendo que Guimaraes e cols mostraram que variações genéticas na *L. (V.) braziliensis* estiveram associadas a apresentações clínicas atípicas(104).

Tabela 1- Diagnósticos diferenciais da Leishmaniose adaptado de Gurel e cols(107)

Leishmaniose cutânea aguda:

- Impetigo, ectima, furunculose, carbunculose
- Hanseníase
- Tuberculose cutis verrucosa
- Infecções micobacterianas atípicas
- Sífilis
- Kerion
- Infecções fúngicas profundas (por exemplo, esporotricose, blastomicose, micetoma, histoplasmose)
- Esporotricose
- Amebíase
- Molusco contagioso
- Verruca vulgaris
- Orf
- Rosácea granulomatosa
- Sarcoidose
- Granuloma de corpo estranho
- Granuloma piogênico
- Linfocitoma cutis
- Linfoma cutâneo de células T
- Carcinoma basocelular
- Carcinoma de células escamosas
- Ceratoacantoma
- Metástases cutâneas

Leishmaniose cutânea crônica e Leishmaniose recidivante:

- Lúpus vulgar
- Hanseníase
- Sarcoidose, lúpus pérnio
- Granuloma facial
- Infiltrado linfocítico de Jessner
- Linfocitoma cutis
- Lúpus eritematoso discóide

- Psoríase
 - Quelóides
 - Goma sífilítica
 - Esporotricose
 - Rinoscleroma
 - Úlceras venosas crônicas
-

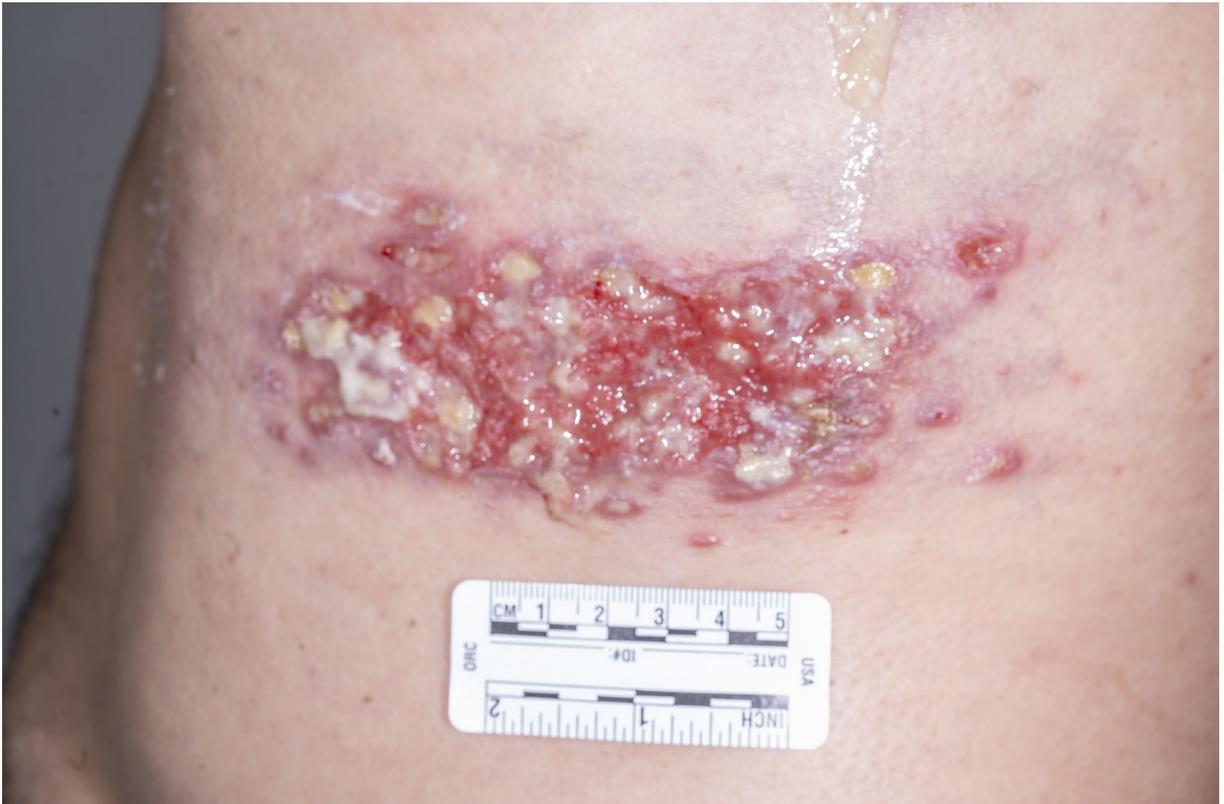


Figura 11- LC atípica zosteriforme em face lateral esquerda de tórax- fonte: arquivo pessoal



Figura 12- LC atípica forma lupóide- apresentando se como múltiplas placas algumas com exulcerações centrais em cotovelo e braço direitos. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 13- LC atípica simulando Lúpus pernio apresentando-se como placa violácea em dorso nasal associada a áreas de exulceração. Fonte: Arquivo pessoal



Figura 14- LC atípica apresentando-se como lesão tumoral em região palpebral esquerda- Fonte arquivo pessoal.



Figura 15- LC atípica apresentando-se como placa violácea associada a exulcerações com configuração cribriforme. Fonte: arquivo pessoal



Figura 16- LC atípica apresentando-se como múltiplas úlceras em membro inferior esquerdo e que foi tratada em outro serviço como úlcera vascular. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 17- LC forma atípica apresentando-se como múltiplas úlceras e fistulas em membro inferior direito simulando micetoma. Formas amastigotas foram encontradas por Imunohistoquímica. Fonte: Arquivo pessoal.

1.3.1.5 Leishmaniose Mucosa- LM

O acometimento mucoso da Leishmaniose pode ocorrer nos diversos contextos clínicos em que a doença se manifesta, podendo ocorrer sem indícios de lesão cutânea prévia(108) ou vir associada outras formas clínicas da Leishmaniose como a LCD(99-101, 109), LDPC(63), Calazar(110, 111), LD(79, 83, 85, 86) e LC(108, 112). Tipicamente a LM se apresenta como acometimento mucoso isolado ou associado a LC e LD levando a lesões destrutivas na mucosa das vias aéreas superiores de lenta progressão(Figura18) (113). O acometimento mucoso associado a outras formas de Leishmaniose geralmente se caracteriza por lesões com apresentação clínica e evolução diversas. Na LCD o acometimento mucoso ocorre em aproximadamente um terço dos casos, mas tem sido descrito como superficial(99-101). Já nos casos associados a Leishmaniose visceral o local mais comum de acometimento não é o nariz mais sim a cavidade oral: a língua, lábios e mucosa de palato mole (63, 111, 114).



Figura 18- Leishmaniose disseminada associada a lesão mucosa em palato- Fonte- Arquivo pessoal.

A LM corresponde a aproximadamente 1,4 e 16,5% dos casos de LTA a depender do estudo(115-120). Estima-se que 3 a 5% dos casos de LC desenvolvam lesão mucosa(113). No Brasil, a LM é atribuída principalmente à *L. (V.) braziliensis*, mas já foram citados na literatura casos por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*(113). Pacientes com infecção por *L. (L.) braziliensis* evoluem para a LM com frequência que varia de 0,3 a 16,5%(115-117, 119, 121-123). Em estudo realizado no Hospital Universitário de Brasília foi observado que 40,8% dos casos de LTA atendidos foram de LM(124). Esta proporção, entretanto, não reflete a prevalência de LTA na população já que, por tratar-se de um centro de referência, é de se esperar que casos mais graves, como os de LM, sejam mais frequentemente encaminhados ao serviço, aumentando sua proporção entre os atendidos no hospital.

Os fatores de risco clássicos para o desenvolvimento de LM são o número e extensão das lesões cutâneas(125), lesões acima da linha da cintura(125), ausência de tratamento ou tratamento inadequado da doença(32, 125), forma disseminada da doença e número de segmentos corporais acometidos(79, 82, 126). Em estudo retrospectivo com 2820 caso de LTA, Machado-Coelho apontou como fatores de risco adicionais idade maior que 22 anos, sexo masculino, duração de doença maior que 4 meses e desnutrição grave(123). A infecção pelo HIV também seria um possível fator de risco já que 43% dos pacientes com coinfeção HIV/LTA teriam a forma mucosa da doença(127, 128). Esta proporção é, entretanto, possivelmente superestimada já que tem como base a frequência relativa de casos reportados na literatura associados a coinfeção(129) o que definitivamente não é uma amostra representativa da população de infectados. Isso é reforçado pelo fato de que estudo europeu mostrou que apenas 0,3% dos pacientes com coinfeção tem lesão mucosa(130). Ademais os casos de coinfeção tem características clínicas diferentes da LM clássica, apresentando frequentemente exame parasitológico positivo na lesão IDRMs negativa(131).

Apesar se ser assunto controverso, a presença de sinais de LC prévia poderia ser encontrada na maior parte dos pacientes com LM (84-87%), segundo estudos(108, 132). A proporção de Leishmaniose mucosa concomitante, definida como aquela que ocorreu associada a lesão cutânea ativa, pode variar entre 8,8% até 30,3%(108, 132, 133). Classicamente, portanto, a LM mais frequentemente acompanha cicatriz cutânea de LC prévia (LM tardia) (108, 132, 133). Por outro lado, grande serie de

casos evidenciou que quando submetidos a exame multidisciplinar até 38% dos pacientes tem a forma mucosa concomitante, ocorrendo mais frequentemente que a forma mucosa tardia (25%)(134). Esta divergência na literatura pode ser consequência de que raros são os serviços que submetem seus pacientes com lesão cutânea exame nasal sistemático(134, 135). Cerca de 70% dos pacientes desenvolvem LM em um intervalo de menos de 5 anos após LC(108), sendo que um estudo mostrou que em apenas 7% dos casos este intervalo foi maior que 10 anos(132). É importante ter em mente, que, diferentemente da lesão cutânea, que é facilmente visível, a lesão mucosa se desenvolve em área não imediatamente visível tornando-a sintomática somente em estágios mais avançados. Conseqüentemente, o intervalo entre a presença da lesão cutânea e o acometimento mucoso tende a ser superestimado na literatura. Isso é reforçado pelo avançado estágio de acometimento mucoso que os pacientes com LM apresentam ao diagnóstico nestes estudos(136, 137).

Os sintomas iniciais de LM são epistaxe, rinorréia persistente, obstrução nasal intermitente e eventual liberação de tecido pela narina (132). Em casuística de serviço no Rio de Janeiro com 132 pacientes com lesão mucosa o sintoma mais frequente foi obstrução nasal (59.8%), seguido de epistaxe (48.4%) e de rinorreia (22.1%)(133). Em outro estudo de Porto Velho-RO 91% dos pacientes apresentavam a eliminação de crostas fétidas, que foi o sintoma mais frequente(136). A LM ainda pode levar a sintomas como ferida em cavidade oral, odinofagia ou disfagia quando acomete a faringe e ainda disfonia e tosse quando acomete a laringe(138, 139).

A LM acomete mais frequentemente o septo e a mucosa nasal(137), mas pode localizar-se nos lábios, boca, faringe, laringe e até vias brônquicas(79, 108, 124, 140, 141). Em estudo com 26 pacientes, Ruas mostrou que a maioria (53.6%) teve lesão em apenas um local da via aerodigestiva, 19,2% em dois locais e 19.2% em três locais. No mesmo estudo, 88.3% dos pacientes tinham lesão em cavidade nasal, 38.5% na cavidade oral, 34.5% na faringe e 19.2% na laringe. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em outros estudos sendo que o acometimento da mucosa nasal tende a ocorrer em 91 a 100% dos casos(108, 132, 140). Um dado relevante é que a grande maioria dos pacientes com lesão oral (84%) tem lesão nasal associada(140). Diante disto, existe divergência na literatura lesões mucosas extra nasais podem acometidos primariamente(132) ou apenas por extensão de lesão de mucosa

nasal(108). Em estudo retrospectivo com 3005 pacientes com LM do estado de São Paulo, apenas um paciente não tinha lesão em mucosa nasal(142). A LM também pode, infreqüentemente, levar a lesão de ouvido. Esta lesão, quando ocorre, é por acometimento do orifício faríngeo da tuba auditiva o que pode levar a otite média secretora crônica(108, 113, 143). Tontura de provável origem vestibular também pode estar associada a LM, neste caso sendo mais provavelmente consequência do tratamento com antimoniato de N metil glucamina(144).

Existe uma relação entre a gravidade das lesões e o tempo de evolução das mesmas(137). A lesão geralmente se inicia como eritema e infiltração na mucosa nasal seguida de granulação e ulceração posterior(Figura 19)(145). A mucosa torna-se espessada hiperemiada e edemaciada com aumento do volume da pirâmide nasal seguindo-se perfuração de septo e comprometimento das estruturas de sustentação do nariz levando a fácies “leishmaniótica” ou “nariz em tapir”(113). Em estudo realizado em serviço de referência do Rio de Janeiro foi verificado que a característica mais frequentemente encontrada nas lesões nasais foi a infiltração(89%), seguido de padrão ulcero-destrutivo(59%) e ulceroso(33,6%)(133). Lessa e Col propuseram classificação das lesões de LM em cinco estágios (Tabela 2)(137). Grande parte dos pacientes neste estudo tiveram diagnóstico tardio da doença uma vez que 48% dos pacientes já apresentavam, ao diagnóstico, lesões em estágios avançados com ulceração de septo ou destruição da arquitetura nasal e que apenas 4% apresentavam doença em estágio 1(137). De forma coerente com a classificação proposta, este autor argumenta que a LM se inicia com o surgimento de nodulação na mucosa nasal(137). A presença e alterações histopatológicas causadas pela LTA já pode, entretanto, estar presente em mucosa apenas hiperemiada(146) sendo a hiperemia de mucosa isoladamente já definidora de LM ativa segundo alguns autores(108, 145).

Tabela 2- Classificação em estágios da LM em mucosa nasal adaptado de Lessa e cols 2012(137)

Estágio	Observação clínica na doença de mucosa nasal
I	Nodulação sem ulceração
II	Ulceração superficial
III	Ulceração profunda
IV	Perfuração de Septo
V	Destruição da arquitetura nasal e alteração da estrutura facial

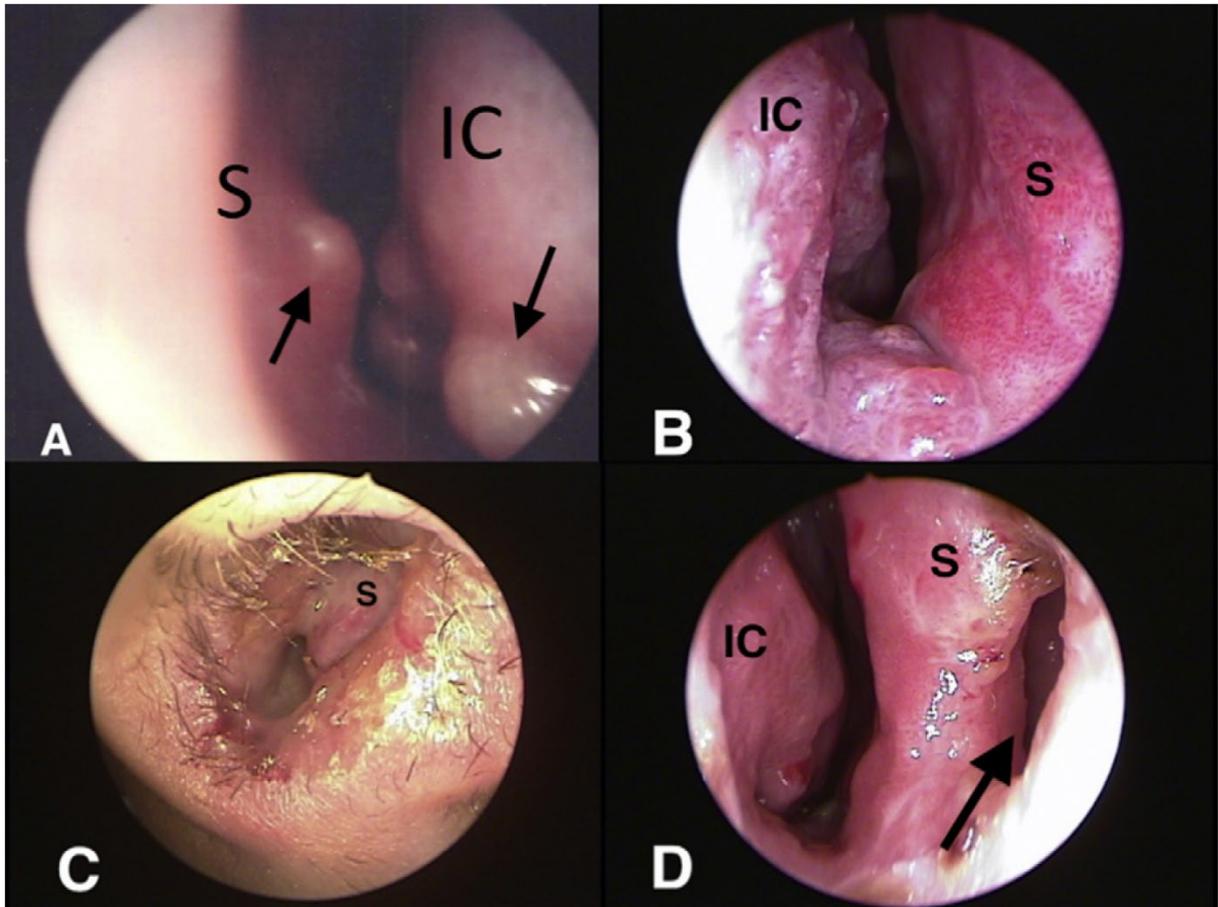


Figura 19- Aspectos clínicos da Leishmaniose mucosa em diferentes fases da doença segundo Lessa(137) . (A) Lesões nodulares (setas) sem ulceração ao longo da ponta nasal, conchas nasais inferiores e septo (estágio I). (B) Lesões granulares finas, caracterizadas por ulcerações superficiais observadas 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-(137)

Classicamente, nesta forma, a IDRМ é positiva em 87-100% dos casos (73, 147) e estudo mais recente mostrou uma sensibilidade de 93,7% a 97,4% para esta forma da doença(133, 148). Alguns estudos também demonstraram que a intensidade da IDRМ é maior nos pacientes com LM, quando comparados àqueles com a LC (103, 149, 150). Em estudo realizado em nosso serviço verificamos que a associação

univariada entre maiores valores da IDRM e a presença da forma mucosa se tornou não significativa após análise multivariada levando em conta o tempo de doença, a idade, positividade para IFI e número de lesões sugerindo que algum outro fator pode explicar a associação entre a LM e o valor da IDRM(151).

Nesta forma de LTA a sensibilidade de exames parasitológicos é extremamente baixa. Em estudo realizado no Hospital Universitário de Brasília apenas 27,7% dos pacientes com LM tiveram esfregaço positivo e 10% a cultura *in vitro* demonstrou o crescimento de *Leishmania sp*(148). A visualização do parasito na histopatologia é também rara nesta forma da doença ocorrendo em apenas 21,7% dos casos segundo Boggild e col(152).

Mesmo exames de biologia molecular tem apenas moderada sensibilidade, em torno de 76%, para o diagnóstico da forma mucosa da doença(153). Uma opção não invasiva para o diagnóstico de LM é a pesquisa de *Leishmania sp* pelo uso de reação em cadeia da polimerase após a coleta de swab nasal. Em estudo realizado em no HUB-UnB a acurácia do PCR de *swab* nasal para o diagnóstico de LM foi de 86% (73.81–93.05) não se mostrando diferente do PCR de fragmento da lesão colhido por biópsia 88.37% (75.52–94.93)(148). No estudo esta técnica de biologia molecular não foi positiva em nenhum dos controles, sem o diagnóstico de LM(148).

1.3.2 Diagnóstico Laboratorial

1.3.2.1 Reação intradérmica de Montenegro (IDRM)

A reação intradérmica foi descrita por Wagener em 1923 e em introduzida por Montenegro em 1926 para o diagnóstico de Leishmaniose(11, 154, 155). 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 20) (26, 156). Ela mede a reação de hipersensibilidade retardada a suspensão de promastigotas mortos(157).

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(158, 159). Apesar de, na LC causada por *L. (V.)*

braziliensis, quase a totalidade dos pacientes apresentarem produção *in vitro* de IFN- γ (160), testes que procuram avaliar a produção de IFN- γ na Leishmaniose ainda não foram capazes de substituir a IDRМ. 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 IDRМ(161). De forma semelhante, em outro estudo com contatos domiciliares de pacientes, 38,9% dos indivíduos que apresentavam IDRМ positiva não produziam IFN- γ quando estimulados *in vitro*(162). Este teste, entretanto, quando associado à IDRМ foi útil em aumentar a estimativa de indivíduos expostos a leishmania entre contatos de 11,7% para 17% (162).

A IDRМ possui alta sensibilidade porem baixa especificidade(13), sendo positivo em uma proporção entre 6,3% e 17% de residentes assintomáticos de áreas endêmicas(41, 163-165). Outra limitação do teste é que ele consiste em uma suspensão de formas promastigotas de leishmania e sua composição é variável a depender da região estudada. A falta de um antígeno padronizado, portanto, dificulta sua interpretação(166) e variações sutis no antígeno utilizado podem resultar em performance diferente(167). Outra dificuldade decorre do fato que o antígeno é de difícil produção em grande escala, com a necessidade de cultura do parasito(166, 168, 169).

Além disso o teste pode ser positivo em pacientes sadios de áreas endêmicas que varia de 6,3% e 17,9% (41, 163-165), sendo que alguns autores consideram que a maior parte destes pacientes com IDRМ positiva e sem evidência de LTA no passado ou no presente, teve uma infecção subclínica(162, 165, 170). Existem também estudos que sugerem que o teste poderia, por si só, causar uma reação imune suficiente para a positivação do teste em uma segunda aplicação(171, 172). Em estudos longitudinais em áreas endêmicas, entretanto, esta positivação da IDRМ é mais comumente atribuída a infecção subclínica entre as aplicações(165).

Positividade do teste na ausência de exposição à leishmania é um assunto ainda controverso. Uma das explicações para o fenômeno seria reação cruzada com outras doenças sendo que estudos antigos mostraram, que alguns pacientes com Pênfigo Foliáceo ou Tuberculose apresentam IDRМ positiva(173), porém posteriormente outro estudo sugeriu que a IDRМ não se torna positiva em indivíduos sem exposição(174), sendo negativa em doentes com tuberculose(175). A relação

com a vacinação 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(176), mas estudos em humanos sugeriram, que a vacinação prévia com o BCG pode inibir a IDR(177, 178). A doença de Chagas é citada com uma das possíveis causas se reações cruzadas pela literatura(13), mas estudo mostrou que 95,1% dos pacientes com doença de chagas tem a IDR negativa, sendo que o autor sugere que a IDR poderia ser utilizada para discriminar infecções por Leishmania ou *T. cruzi* em áreas nas quais os dois parasitos estão presentes(179). Em estudo no Rio de Janeiro, grande proporção de pacientes com Esporotricose tiveram IDR positiva sendo que reações cruzadas ou coinfeções podem explicar parte dos casos(180).

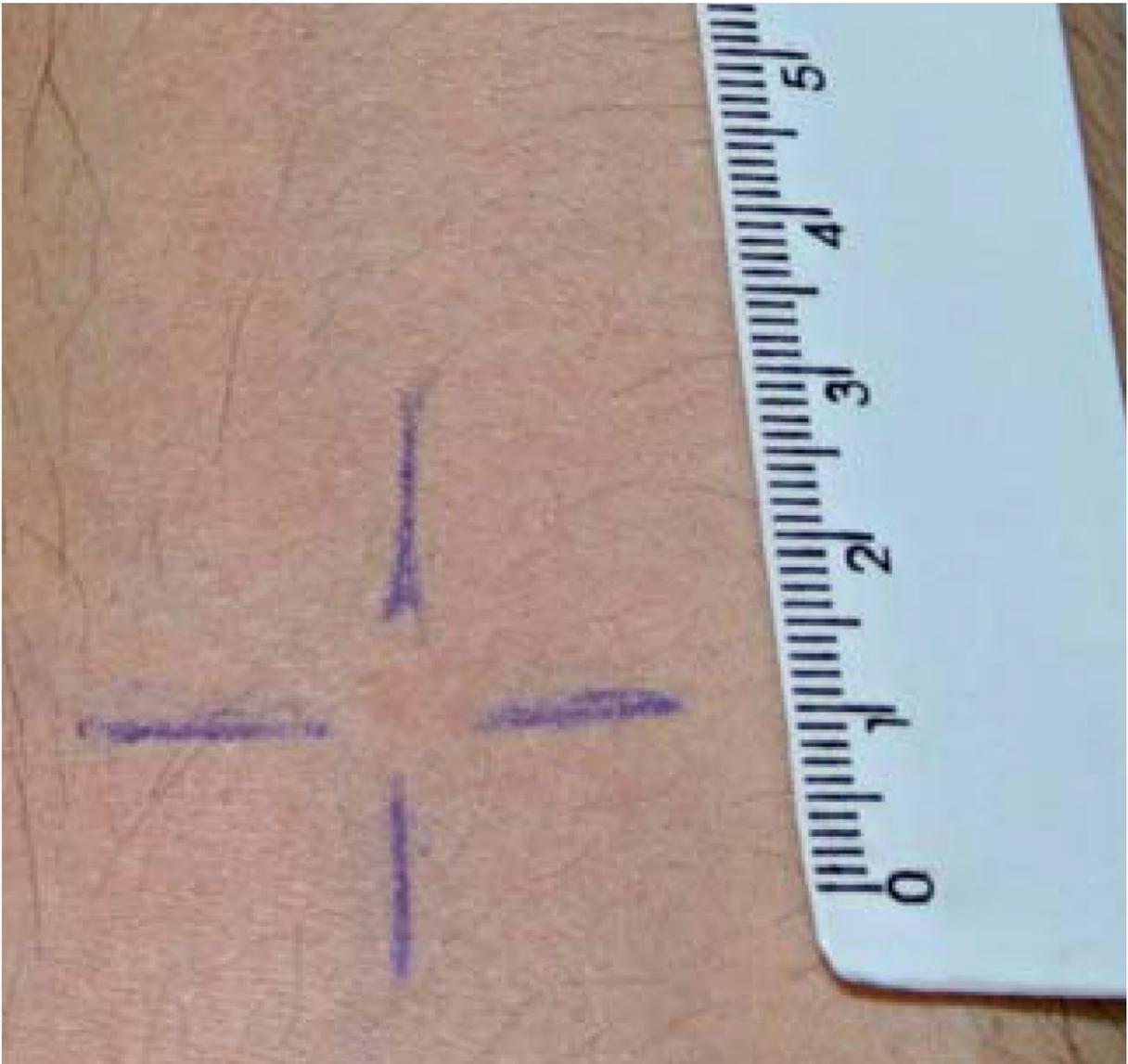


Figura 20 — Intradermoreação de Montenegro: após a aplicação intradérmica de um solução contendo preparação antigênica de formas promastigotas de *Leishmania*. O resultado deve ser avaliado dentro de 48 horas, com uma caneta esferográfica, é positivo caso se forme uma pápula maior ou igual a 5mm. Fonte- Ref (13)

1.3.2.2 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(13, 181). Estes testes podem ter, entretanto, interpretação problemática, principalmente quando seus títulos encontram-se próximos aos pontos de corte(26).

A imunofluorescência indireta (IFI) tem uma sensibilidade que varia de 47-79%(75, 182-185). 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 *L. (V.) braziliensis* e de apenas 54,3% quando utilizado o antígeno de *L. (L.) amazonensis* (186). Houve tendência de maior sensibilidade em casos relacionados a *L. (V.) braziliensis* quando comparados aos causados por *L. (V.) guyanensis* em outro estudo(187). Em estudo do velho mundo, a positividade em pacientes com LC causada por *L. (L.) major* foi de apenas 47%(182). Na população de pacientes com IDRMs positiva e lesão ativa, entretanto, a positividade chega a 90%(188). 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(189, 190), sendo que em estudo epidemiológico a presença de IFI positiva com IDRMs negativa é atribuída à doença de Chagas(191).

É sugerido na literatura que os títulos de anticorpos poderiam ser utilizados para monitorar o tratamento(192). 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(185). 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(184, 185, 193). Outro estudo também mostrou que o desaparecimento do antígeno na lesão após tratamento foi associado a diminuição dos títulos de anticorpos na imunofluorescência(194). 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 *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*(195, 196). Recente metanálise que incluiu tanto a forma cutânea como a visceral argumenta que o uso de títulos de anticorpos para avaliar resposta a terapêutica na leishmaniose apresenta muitas limitações, sendo portanto controversa(197).

Em termos de acurácia diagnóstica o ELISA teve desempenho semelhante a IFI em um estudo sendo positivo em 88,9% dos doentes quando utilizado o antígeno de *L. (V.) braziliensis* (186). Em outro estudo realizado no Paraná-Brasil o teste teve

alta acurácia com sensibilidade de 93% e especificidade de 94,8%(198). Uma nova técnica MCA-ELISA (Amastigote Membrane CA ELISA) teve sensibilidade de 98% para o diagnóstico de LTA e, quando soros reativos para *T. cruzi* foram excluídos, a especificidade do teste subiu de 63,6% para 98,4%(199). O Imunoblot mostrou-se um método de grande sensibilidade (96,6%) e possibilita a identificação e exclusão de proteínas responsáveis por reações cruzadas(186). Por sua vez o Western Blot é um teste promissor com sensibilidade de 100% em estudo preliminar. Este é, entretanto, um teste caro e que demanda estrutura laboratorial mais robusta(13, 182).

1.3.2.3 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(26). Ainda existe, entretanto, muita discussão na literatura de qual o método traria maior acurácia ao exame(13). A punção aspirativa se mostrou mais sensível que a raspagem da lesão em um estudo iraniano(200). Um novo método utilizando uma broca dentária foi semelhante a punção aspirativa e melhor que os demais métodos testados em outro estudo(201). Quando ao local de coleta de amostra, o centro da lesão foi mais sensível que da periferia(202). 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 21)(203).

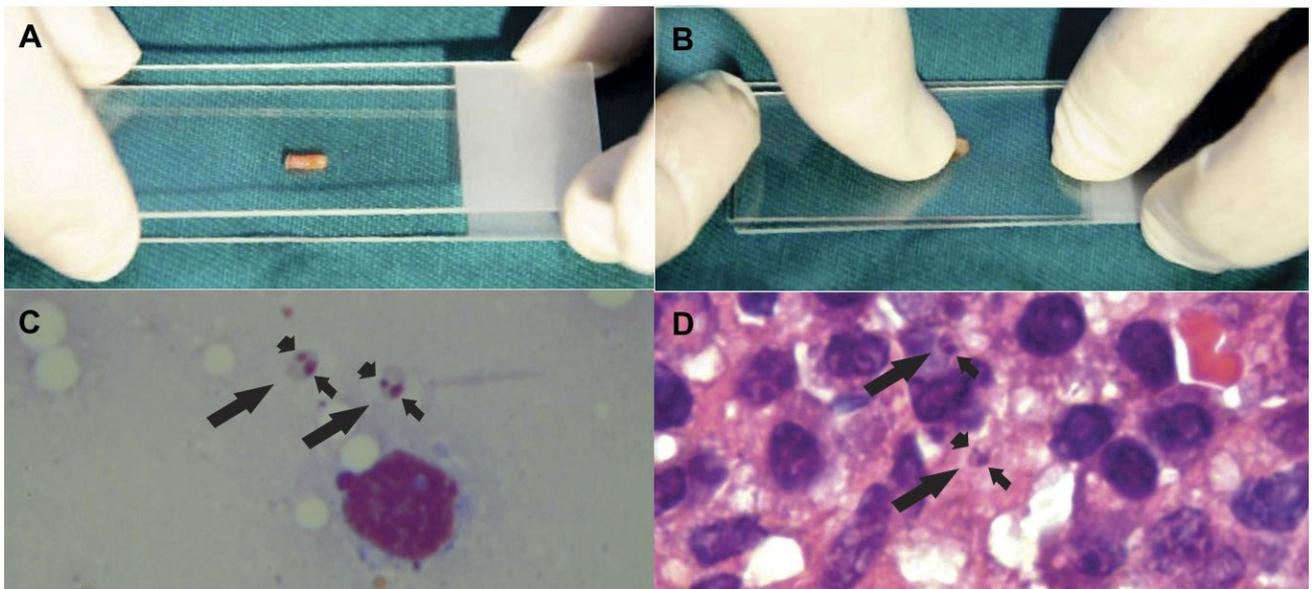


Figura 21 — A e B- Coleta do esfregaço por pressão de fragmento de lesão de acordo com Sousa e col. C- Esfregaço obtido por este método mostrando duas formas amastigotas de *Leishmania spp*(setas longas), com núcleos (setas curtas) e cinetoplastos (ponta de seta); D- Formas amastigotas em cortes histológicos (setas longas), com núcleos (seta curta) em uma observa-se cinetoplasto(ponta de seta)(203).

Em lesões mucosas, dependendo do local acometido, a coleta pode ser feita com raspagem com uso de bisturi, escova de citologia e lavagem(204). 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(26).

A sensibilidade do teste de acordo com diferentes estudos está entre 48%-89% a depender da população estudada e da técnica utilizada(75, 200, 205). O desempenho do teste, entretanto, tende a variar bastante com a forma e tempo de evolução da doença sendo pior nas formas crônicas hiperérgicas como a LM(13).

1.3.2.4 Cultura

De acordo com o último manual do Ministério da Saúde o cultivo pode ser realizado 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)(26). A sensibilidade da cultura in vitro varia entre 37% a 67,5% utilizando os métodos de coleta e cultivo tradicionais (75, 206-208). 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%(207). A vantagem dos meios de microcultura é que eles contêm pequeno volume e são fáceis de manusear mesmo se a carga parasitária for baixa(209).

Existem, entretanto, diversas variações nas técnicas de coleta e de cultivo(13) que podem ter impacto na acurácia diagnóstica. As culturas podem ser também realizadas através da inoculação em animais(26) sendo que Dorta e cols mostraram que esta técnica pode dobrar a sensibilidade da cultura do fragmento de lesões nasais, de 11,1% para 20%(210).

Com relação a forma de coleta do material, a cultura do fragmento de biópsia também tendeu a ter menor positividade que a cultura do aspirado(211). 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%, a combinação dos dois métodos, entretanto, chegou a uma sensibilidade de 79,3%(69).

1.3.2.5 Técnicas moleculares

Técnicas de biologia molecular são promissoras, mas não são disponíveis na grande maioria dos centros de referência(13). Na clínica dermatológica estas técnicas podem ser utilizadas não somente no diagnóstico como também na identificação da espécie e na quantificação da *Leishmania* com potenciais aplicações na monitorização de resposta terapêutica(212). A técnica tem também sido usada no ramo da pesquisa clínica em estudos epidemiológicos(213), estudos que avaliam o ciclo de vida do parasito(214) e sua viabilidade(215) entre outros. As principais técnicas utilizadas são a reação em cadeia da polimerase (PCR)(13), o sequenciamento(216) e técnicas de amplificação isotérmica do DNA(217). Aqui discutiremos mais detalhadamente apenas a PCR, que foi a técnica utilizada para avaliar a variável dependente dos estudos apresentados nos capítulos 3 e 4.

1.3.2.5.1 Coleta do material

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, blocos de parafina e swabs da lesão (208, 218-222). A coleta através do swab

da lesão é um método não invasivo que se mostrou mais sensível que coleta através de aspirado em um estudo(222).

No caso de lesão mucosa, swab nasal(223), escova de citologia(224) e fragmento obtido por biópsia(225) são métodos descritos para a coleta do material. As técnicas que utilizam a PCR são de grande importância para o diagnóstico especialmente das formas mucosas devido à dificuldade de se encontrar o parasito(226, 227). Estas técnicas de modo geral envolvem a preparação do ácido nucleico (AN), a amplificação e a análise do material amplificado(13, 228).

1.3.2.5.1 Preparação do Ácido Nucleico

O objetivo da preparação do AN é a sua liberação da célula para uso dos procedimentos diagnósticos seguintes(228, 229). A preparação pode incluir o isolamento, extração, purificação e separação do AN e estes são termos utilizados de forma intercambiável na literatura(228). A maioria dos procedimentos utilizam três etapas: 1- Liberação do AN da amostra; 2- separação ou isolamento do AN de interesse de outros componentes celulares; 3- purificação do AN removendo componentes inibitórios e 4- Concentração(opcional)(228). O ácido nucleico de interesse deve ser livre de contaminantes incluindo proteínas, carboidratos, lipídios e outros ácidos nucleicos ex: DNA livre de RNA ou RNA livre de DNA(230).

O processo de liberação do AN da célula vai depender do tecido estudado(229) e pode requerer somente a diluição com solução salinizada(226, 231). Amostras de tecido frescas ou congeladas, comumente obtidas na investigação de LTA(13), podem ser homogeneizadas ou fragmentadas com o bisturi antes de se iniciar o isolamento do AN(229). Lise enzimática com proteinase K, lisozima ou mutanolizina além de ciclos de calor ou de congelamento e descongelamento podem aumentar a eficácia da liberação do AN(228). No caso de swabs de mucosa protocolo de extração proposto por Ghatak e cols utiliza proteinase K e incubação da amostra a 56 °C(232). No Laboratório de dermatomicologia da UnB é utilizado o kit de purificação da Life technologies (Invitrogen, Carlsbad, CA) utilizando-se o protocolo do fabricante. No caso de fragmento de tecido a amostra é incubada por 12 horas com tampão de digestão e proteinase K, no caso de swabs o tempo de incubação é de 10 minutos e utiliza-se proteinase K e Tampão Fostato-salino (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Existe uma grande variedade de métodos de isolamento e purificação do AN e que dependem grandemente do tipo de amostra, do AN a ser extraído e do método de análise a ser aplicado ao final(233). Os métodos de extração podem ser divididos basicamente em extração líquida e extração em fase sólida(233). A extração em fase líquida é um método utilizado para separar AN baseado na não solubilidade entre líquidos e pode ser orgânica e inorgânica(229, 234). O isolamento orgânico é realizado utilizando-se soluções com combinam de alta salinidade, baixo pH e uma mistura orgânica de fenol e clorofórmio(229). O isolamento inorgânico, também chamado de "Salting out"(Figura 22), foi desenvolvido para evitar a exposição a agentes cáusticos, como o fenol, e utiliza soluções ácidas e altamente salinas para precipitar proteínas deixando o DNA em solução(226, 229).

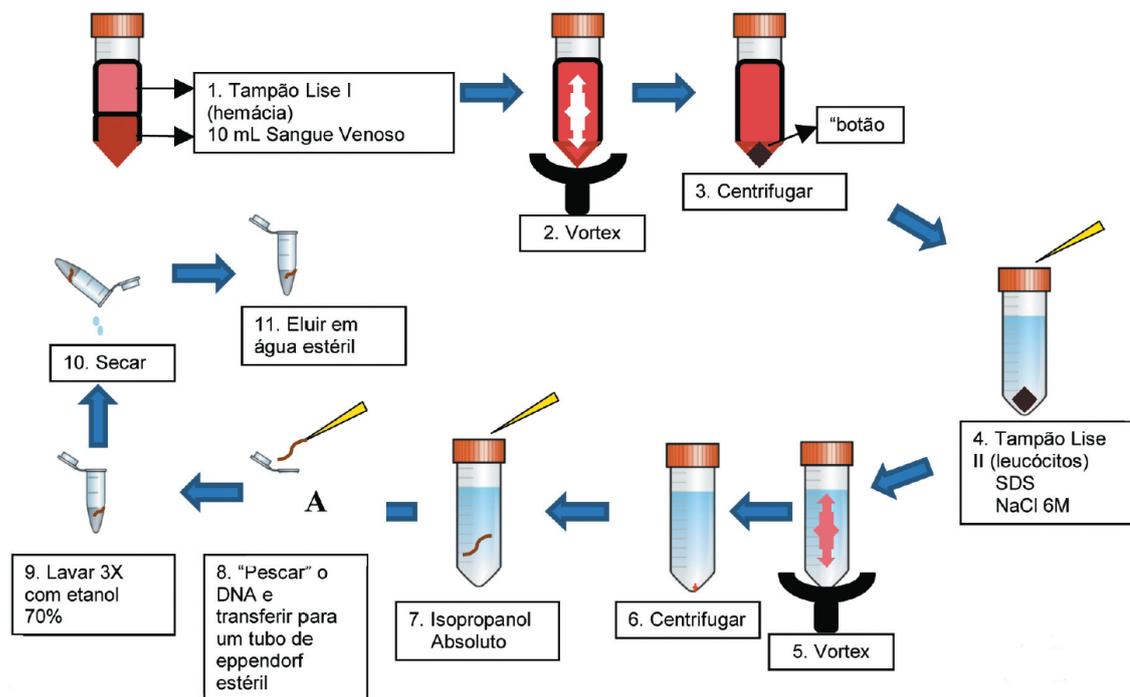


Figura 22- Purificação do DNA por técnica "Salting out". Adaptado de Roselino e Cols(226).

Uma das grandes desvantagens dos métodos de extração líquida orgânicos está na necessidade de grandes volumes de solventes necessários cujo descarte adequado é problemático(233). Além disso, as técnicas de extração líquida também requerem treinamento e boa coordenação motora para que perdas de AN sejam

evitadas(233). Métodos de extração em fase sólida foram desenvolvidos para superar estes problemas mostrando-se mais rápidos e efetivos(229). Os métodos que utilizam sílica como matriz solida são comumente usados (228) já que todos os AN se ligam a sílica em condições específicas(235). O método mais comum utiliza uma coluna de sílica em que o AN fica “imobilizado” e é lavado com soluções tampão com alta salinidade e baixo PH(Figura 23)(228, 229). Após purificação o AN é removido da coluna com solução de eluição através de gravidade, vácuo ou força centrifuga(229). No laboratório de Dermatomicologia da UnB é utilizada extração sólida com coluna de sílica e posterior eluição com força centrifuga através de Kit de extração (Invitrogen, Carlsbad, CA).

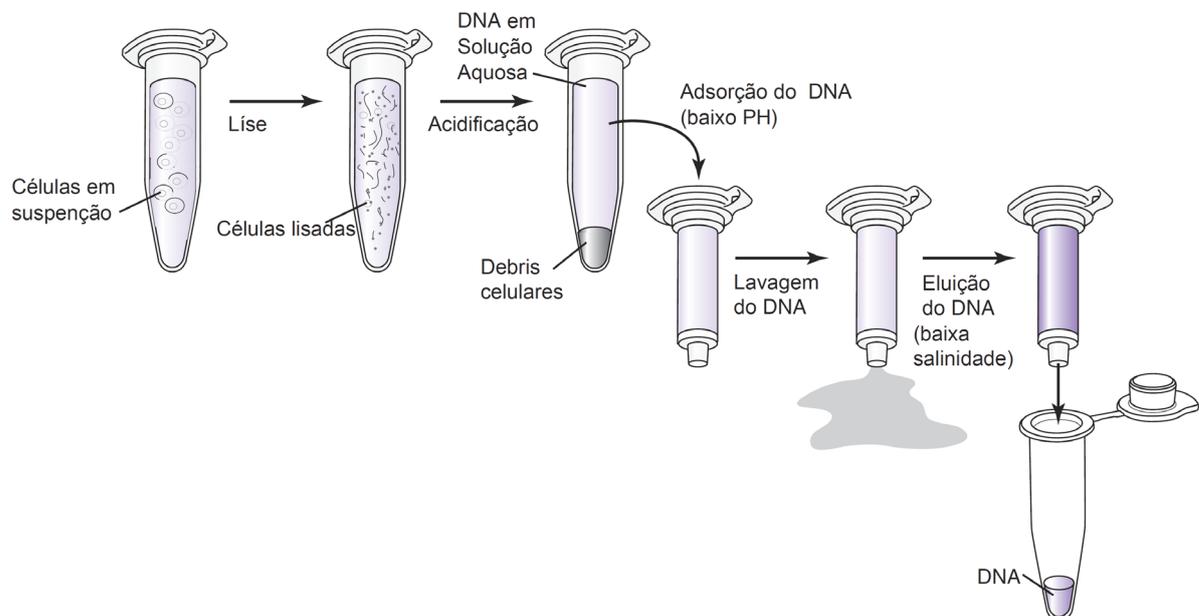


Figura 23- Isolamento do DNA em fase sólida (coluna de sílica)- Adaptado de Buckingham 2019(229).

1.3.2.5.2 Amplificação e Análise

Após a extração do DNA é necessário método para detecção deste DNA na amostra. Uma das primeiras técnicas a serem utilizadas consistia na digestão do DNA por enzimas de restrição associada a eletroforese do DNA e hibridização com sequencias complementares seguida de detecção através de autoradiografia ou fluorografia sendo a técnica mais utilizada apelidada de “*Southern Blot*”(236, 237). Estas técnicas

de hibridização direta sem amplificação do ácido nucléico são limitadas pela baixa sensibilidade(238).

A amplificação da sequência de AN permitiu ampliou muito a aplicação das técnicas de biologia molecular na medida em que mínima quantidade de material genético passou a ser detectada(237). A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste em ciclos de desnaturação, anelamento e extensão da sequência de interesse que ocorrem a diferentes temperaturas(226). Ao aquecer a amostra ocorre separação das fitas de AN e com o resfriamento ocorre ligação sequencias iniciadoras específicas (Primers) ao fragmento de ácido nucléico de interesse e posterior alongamento da sequência através da enzima Polimerase(237). São produzidas, portanto, sequencias de AN específicas e complementares que são elas mesmas modelos para uma nova amplificação no próximo ciclo(Figura 24). Desta forma a cada ciclo a sequência de interesse dobra em quantidade (237). A substituição da Polimerase termolábil de *E. Coli* pela polimerase da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* (Taq), que é termoestável, tornou o método mais prático não sendo mais necessária a adição de nova polimerase a cada ciclo da reação(239). Outra forma de amplificação descrita é a “Amplificação quantitativa baseada em sequência de ácido nucleico” (do inglês: NASBA). Ela apresenta vantagens quando o alvo molecular é o RNA. Além de ser uma reação isotérmica, eliminando a necessidade de um termociclador, durante a reação o produto de RNA é diretamente amplificado não sofrendo interferência do DNA presente na amostra. Não é necessária portando a realização de método específico para retirada do DNA da amostra(240).

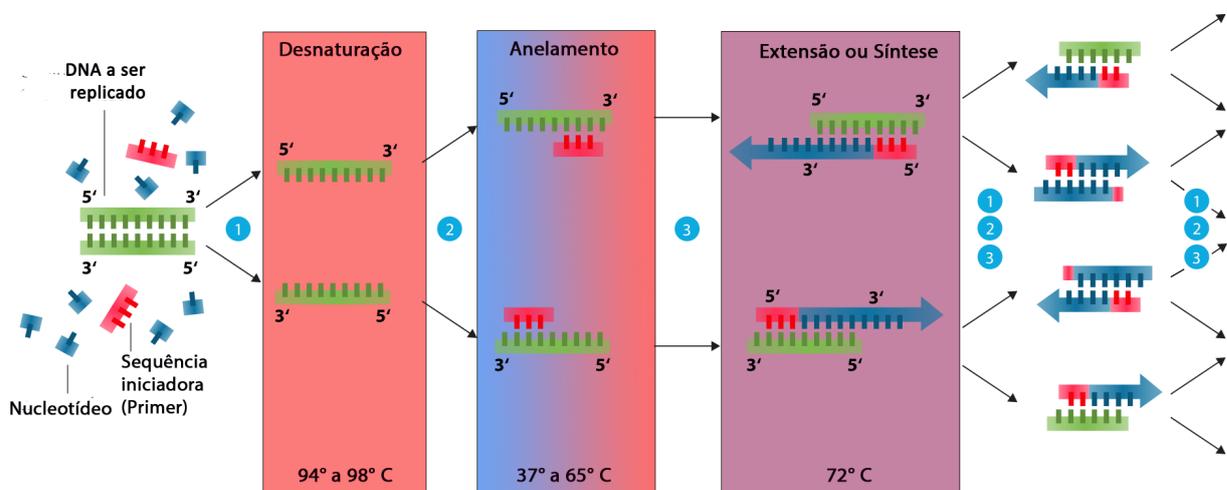


Figura 24- Reação em cadeia da polimerase etapas e temperaturas de acordo com Roselino e cols(226).

Na técnica de PCR convencional à amplificação e a análise dos produtos ocorrem em tempos diferentes(241). O resultado da reação é avaliado com base no tamanho esperado do produto amplificado(238). Comumente isso é feito através de eletroforese em gel de acrilamida ou de agarose sendo o produto marcado mais comumente com prata ou brometo de etídio respectivamente(226). O tamanho do fragmento é então comparado com uma referência que contém fragmentos de DNA de tamanhos predeterminados geralmente com saltos de 100pb (pares de bases) e também são adicionados um controle negativo e um controle positivo(218). O produto amplificado também pode ser submetido a digestão por enzimas de restrição e submetido a eletroforese possibilitando a diferenciação de espécies, técnica chamada de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (do inglês: RFLP)(242). Os procedimentos de amplificação e análise, entretanto, podem ser realizados simultaneamente em uma técnica chamada de PCR em tempo real(243). Estas técnicas costumemente utilizam marcadores fluorescentes que se ligam ao DNA através de sondas (*probes*) ou corantes intercalantes de AN, que emitem fluorescência ao se ligar com o AN de dupla hélice (ex: o *Sybr green*)(238, 244). O *Sybr green* é um corante fluorescente que tem sua fluorescência significativamente aumentada ao se ligar a dupla cadeia de DNA(245). Isso permite que com o aumento gradual da temperatura possa se observar a diminuição da fluorescência a medida que as cadeias do DNA amplificado se separam formando a curva de dissociação(Figura 25)(238). A temperatura em que a dissociação ocorre vai ser maior em fragmentos com maior conteúdo de CG e com maior extensão, mas também vai depender da sequência de bases nitrogenadas(246). Além de ser uma técnica mais barata diferentes curvas de dissociação produzidas podem ajudar na identificação das espécies de *Leishmania* (244, 247, 248). Por outro lado podem ser gerados produtos não específicos ou dímeros de iniciadores levando a resultados superestimados ou falso positivos(247). A identificação destes produtos pode ser eventualmente complexa exigindo análise da curva de dissociação(248) ou a eletroforese dos produtos de amplificação(249).

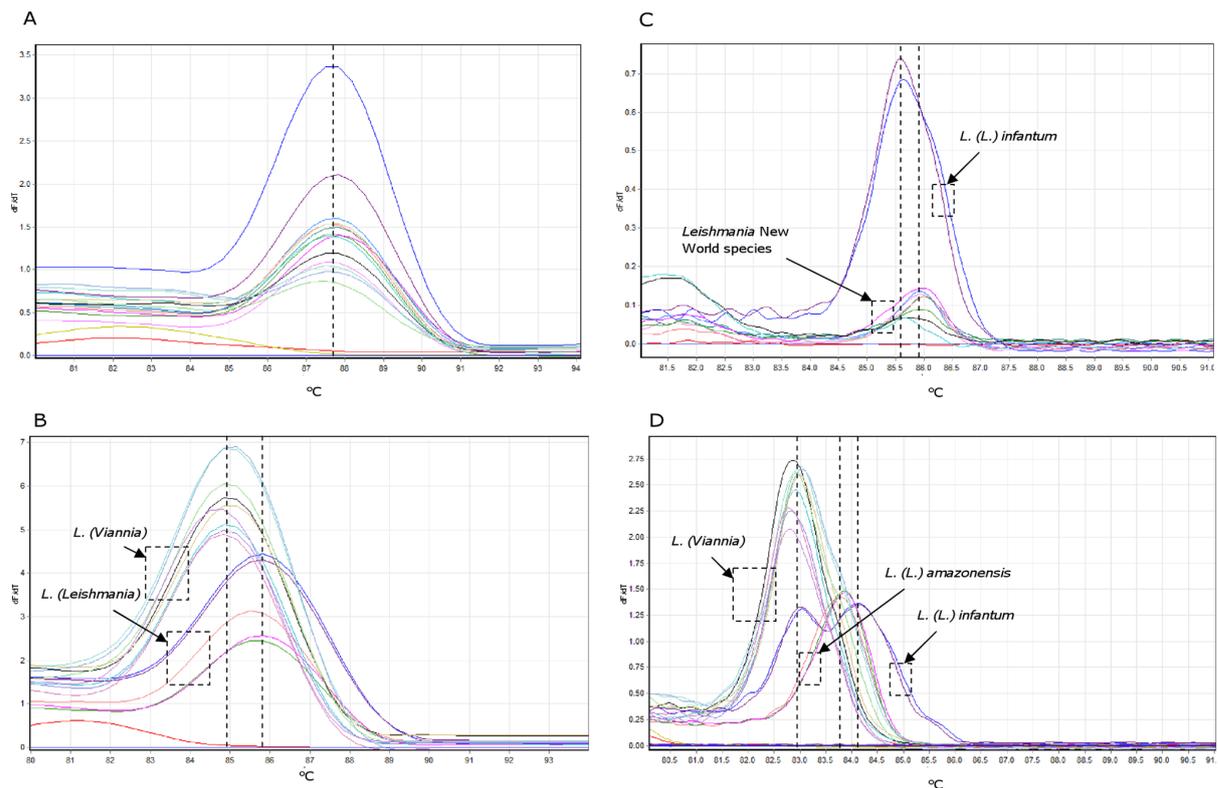


Figura 25: Identificação de diferentes espécies de *Leishmania* utilizando o corante intercalante Sybr Green e os iniciadores MaryF-MaryR- Adaptado de Cecarelli 2014(249).

Entre as técnicas que utilizam sonda, a mais comumente utilizada é a de hidrólise de sondas TaqMan. A sonda contém em seu terminal 5' uma molécula fluorescente e em seu terminal 3' um quencher (molécula que diminui a fluorescência), quando ocorre a amplificação a molécula fluorescente é separada do quencher permitindo a emissão de luz fluorescente(Figura 26)(250). Apesar de mais cara, esta técnica tem algumas vantagens como a especificidade dada pela adição da sonda(212), a possibilidade de identificação do subgênero da leishmania (244) e a realização de reações multiplex(212). Outra técnica utilizada é que utiliza sondas de transferência de energia ressonante por fluorescência (FRET) que consiste de duas sondas adjacentes que se ligam com transferência de energia luminosa e emissão de sinal(238). Esta técnica tem o potencial de diferenciar as espécies de *Leishmania* através de análise da curva de dissociação(251). Outro exemplo de utilização de sonda na PCR em tempo real são sondas *Scorpion*, que são compostas pela sonda e duas fragmentos complementares de NA ligadas covalentemente possuindo uma molécula fluorescente e um *quencher* em cada extremidade. Com a ligação da sonda a sequência alvo ocorrer separação do *quencher* da molécula fluorescente permitindo a liberação de fluorescência(238).

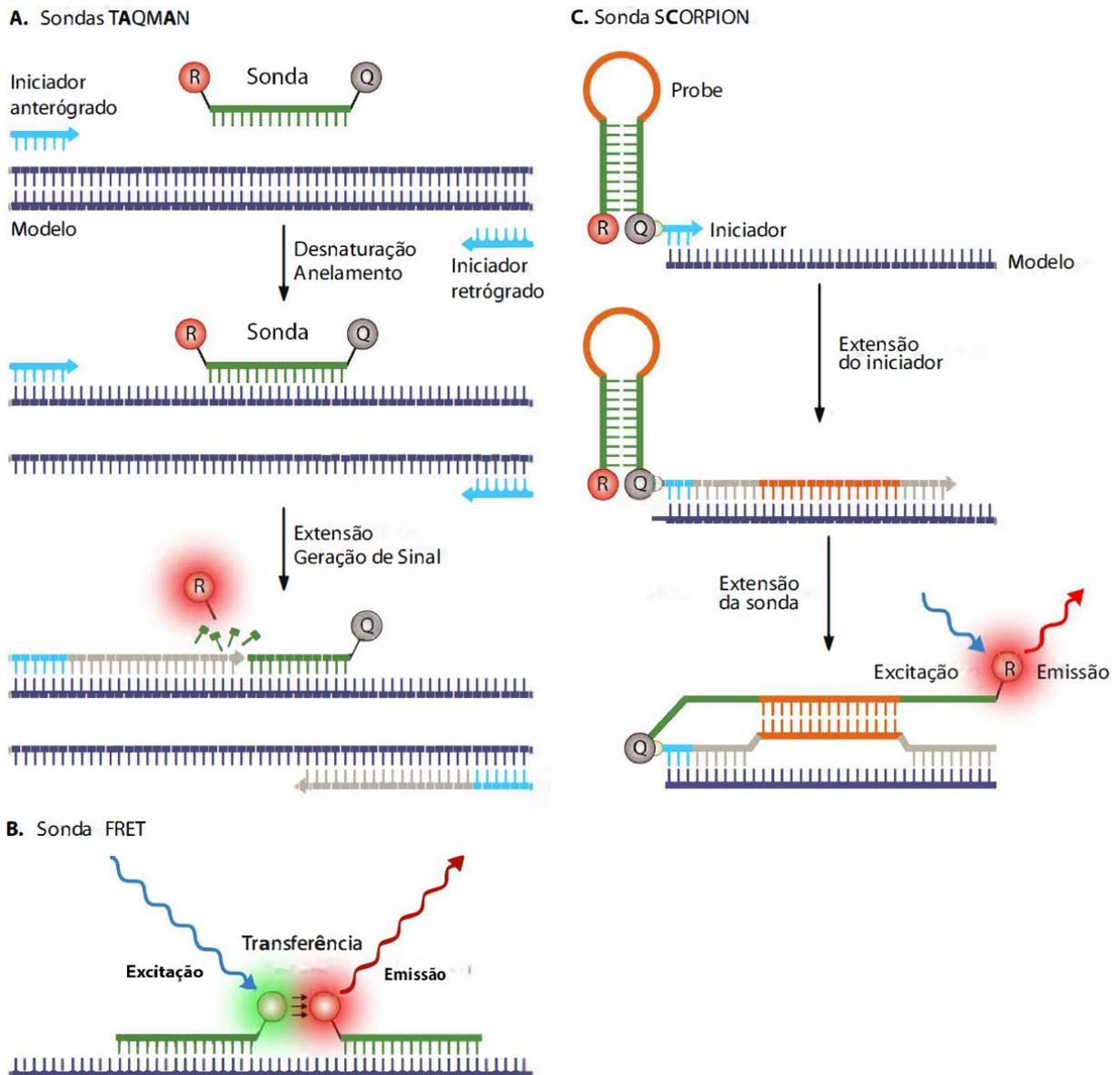


Figura 26- Três exemplos de PCRs em tempo real. 1- Sondas Taqman; 2- Sondas de transferência de energia ressonante por fluorescência (FRET); 3- Sondas Scorpion. Adaptado de VerWeij e cols(238)

Outra técnica de biologia molecular utilizada, que é capaz de distinguir a leishmania nos níveis de gênero, seção, subgênero, complexo e foco, é o sequenciamento(252, 253). A realização de sequenciamento de alvos de AN amplificados por PCR não necessita de cultura prévia e apresenta alta sensibilidade e especificidade(252, 254). Várias sequências já foram estudadas para a identificação como o SSU sRNA(254), hsp70(242), ITS2 RNA(216) e cyb rRNA(255). Esta identificação também é limitada pela sequência alvo amplificada, sendo que sequências com baixo polimorfismo não possibilitam a diferenciação e tipagem abaixo

do nível do género(252). Outra limitação importante do sequenciamento é o alto custo quando comparado as outras técnicas com objetivos semelhantes(226).

1.3.2.5.3 Sondas e Primers utilizados

Diversas técnicas biologia molecular vem sido descritas utilizando regiões codificantes e não codificantes do material genético da leishmania(247). O material genético da Leishmania está contido em 34 a 36 cromossomos(256) e, assim como todos os protozoários flagelados da ordem kinetoplastida, possuiu DNA mitocondrial organizado em um cinetoplasto (kDNA)(257). Esta é uma estrutura semelhante a uma rede de pesca que é condensada formando um disco. A rede consiste de DNA de dupla hélice encadeados em mesma topografia formando duas estruturas morfológicas distintas: os maxiciclos e o miniciclos(258). Cerca de 95% do kDNA está nos miniciclos formando RNA guia (gRNA) que é responsável pela edição do precursor do RNA mensageiro (pré-mRNA) que é produzido utilizando DNA dos maxiciclos(259). O kDNA possui duas classes de sequencias nucleotídeos uma conservada e uma variável(260). As sequencias variáveis costumam ser únicas já as sequencias conservadas se repetem diversas vezes no genoma da Leishmania(247). Com relação ao DNA cromossômico a Leishmania possui dezenas a centenas de cópias DNA ribossômico(rDNA) que possuem genes que codificam diferentes regiões do ribossomo (18S, 5.8S e α LSU) além de espaçadores não codificantes (Espaçador interno transcrito- o inglês ITS)(261). Devido a menor pressão evolutiva, os espaçadores internos tem alto polimorfismo quando comparados as regiões codificantes(216). Entre as outras possíveis sequências utilizadas estão os genes da HSP70, DNA polimerase, glicose 6 fosfato desidrogenase(G6PD), glicose fosfato isomerase (GPI), manose fosfato isomerase (MPI) e 6 fosfogluconato isomerase(6PGD). Exceto o gene que codifica a HSP70 todos estes são genes de cópia única(247). Além de objetivos diagnósticos a quantificação do número de parasitas eventualmente é um dos objetivos do teste e o kDNA por ter número de cópias variável entre as espécies pode ser falho(262). Teoricamente genes de cópia única como o da DNA polimerase, tem vantagem neste quesito(262). Outra limitação do kDNA como alvo é que, devido a sua natureza conservada, pode ser difícil identificar diferentes espécies de Leishmania baseado em suas sequencias(249).

Quando o objetivo é identificação, sequencias com maior polimorfismo, como a ITS2, teriam uma vantagem(216).

Apesar da grande variação nas técnicas, a sensibilidade dos melhores métodos é alta estando entre 90% e 100% para a LC(13, 208, 219). 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(153).

1.3.2.6 Histopatologia

Na LTA causada por *L. (V.) braziliensis*, 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 tuberculóide(263)(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(264). 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(84).

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 necrótico 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 tuberculóide	Reação granulomatosa epitelióide organizada no seio do infiltrado linfohistioplasmocitário

Adaptado de Magalhães 1986(263).

Os achados histopatológicos, entretanto, 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(265, 266). 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(265, 267). Choi e colaboradores procuraram sintetizar os diferentes padrões histológico encontrados em cada forma clínica da doença(Tabela 3)(268).

Quadro 3 — Achados Histopatológicos segundo a forma clínica. Adaptados de Choi e cols 2002(268).

Forma	Achados epidérmicos	Achados dérmicos	Presença de organismos na lesão	Organização do infiltrado
LC	Hiperqueratose, paraqueratose, foliculares plugs necrose,	Linfócitos + histiócitos, plasmócitos ocasionais,	Abundantes em lesões iniciais,	Difuso

	Degeneração de células basais, raros parasitos nas células epidérmicas	raros eosinófilos e neutrófilos	poucos ou ausentes em tardias	
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
LDPC	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 cutâneo difusa; LR: Leishmaniose recidiva cútis, LDPC: Leishmaniose Dérmica pós-calazar; LM: Leishmaniose mucosa; LV: Leishmaniose visceral.				

Os padrões histológicos da LTA também foram avaliados por um grupo brasileiro(269), que depois foi modificado para se aplicar tanto ao novo como ao velho mundo(270). Este autor classificava a resposta inflamatória como celular (C), fibrinóide (F) ou mista (M) sendo está associada ao grau de resposta histológica da seguinte forma: 1- não-reativa, 2- reativa, 3- infiltrativa, 4- tuberculóide 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- Tuberculóide reativo e E- Lupóide. Além disso,

é analisada a resposta dos macrófagos, está podendo ser: A- macrofágica anérgica, B-Intermediária e C- Tuberculóide(271).

1.4 A RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO E O DESENVOLVIMENTO DA FORMA MUCOSA

A resposta imune tem papel central na patogênese da Leishmaniose mucosa com predomínio da resposta imune celular(145). A Leishmaniose mucosa, entretanto, tem sido relatada em associação com imunodepressão de origem medicamentosa(272) em pacientes em uso de corticoesteróides(273-276), inibidores da calcineurina(274, 275), azatioprina(276), metotrexate(277) e medicações anti-TNF- α (277-280). A AIDS também tem sido vista em conexão com LM(131, 281-283) sendo que estudos mostraram associação entre a coinfeção com o HIV e o risco de recorrência de Leishmaniose mucosa(127-129, 284). O acometimento mucoso ocorreu em 80% dos casos em uma serie de casos de um único centro no Brasil(131) o que é uma proporção maior que a encontrada na população geral de 0,3% a 16,5%(115-119, 122, 123). No estudo, entretanto, os casos de LM associados a coinfeção pelo HIV foram laboratorialmente atípicas sendo o exame direto positivo para Leishmania em 77% (10/13) e a IDRM foi negativa em 62,5%(5/8) dos pacientes(131) o que é diferente do padrão típico esperado para LM na qual existe baixa carga parasitária e alta reação de hipersensibilidade retardada ao antígeno(73, 145, 149).

A apresentação clínica da LM está associada não somente a alterações quantitativas na resposta imune(imunodeficiência) como também qualitativas. A Leishmaniose tem sido relatada em sua forma clínica hiperérgica em associação com a hanseníase virchowiana sugerindo que a alteração imunitária nestas doenças é antígeno específica(285). No mesmo sentido, em serie de nove casos Vernal e cols analisaram as manifestações clínicas de pacientes que tiveram hanseníase e LTA. Os autores encontraram que, em oito dos nove casos, a análise evidenciou divergência nos espectro clínico imunológico entre as doenças e em dois casos houve apresentação em polos opostos(286). Azevedo Coutinho também relataram caso de hanseníase virchowiana associada a LM, que seriam de polos imunológicos

opostos. De maneira interessante, o autor mostrou que células mononucleares do sangue periférico deste paciente diminuía a produção de IFN- γ estimulada pelo antígeno de Leishmania quando também expostas ao antígeno de *M. leprae* sugerindo que apesar da resposta as duas doenças ser antígeno específica, existe interação entre elas (287).

CAPÍTULO 2 – ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE ANTÍGENO DE LEISHMANIA
PREPARADO NA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

2.1 INTRODUÇÃO

A IDRМ é um teste de fácil aplicação, tem baixo custo e não requer equipamentos sofisticados, podendo ser realizada in loco(288). Está é uma característica essencial do teste considerando que a doença tem sua maior incidência em áreas onde o acesso a exames de biologia molecular é difícil ou impossível. Em grande série de casos do nordeste brasileiro, onde quase metade dos pacientes não teve exames confirmatórios, a IDRМ realizada foi positiva em 46,3% do total de casos sendo esta proporção maior que a cultura(22%), imuno-histoquímica (33%), histopatologia (27,3%) e exame direto(37,7%)(289).

No Brasil, na época do início do estudo, o antígeno de Montenegro era produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos(CPPI)(290, 291). A partir de 2019, entretanto, questões regulatórias impediram sua produção para uso clínico(291). A partir de então buscamos validar para uso em pesquisa um antígeno produzido na própria universidade. A IDRМ estava entre os critérios para a inclusão dos pacientes nos estudos relatados no capítulo 3 e 4 e a falta do antígeno foi entendida, na época, como possível fator que prejudicaria o recrutamento dos pacientes. Desta forma entendemos como necessária a validação de novo antígeno para a utilização em pesquisa. Planejamos, primeiramente testes de segurança em animais, sendo este um passo necessário antes da realização de estudos de segurança em humanos(292). Secundariamente buscamos avaliar a resposta ao diluente do antígeno, que já se mostrou importante em outros estudos(13, 293).

2.2 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo geral:

Avaliar a segurança de um antígeno de leishmania em camundongos *Mus musculus* C57BL6

3.1.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a infectividade do antígeno através de avaliação clínica, histopatológica e a pesquisa de parasitos por reação em cadeia da polimerase

2. Avaliar a presença de efeitos colaterais sistêmicos pela dosagem de marcadores de colestase, de lesão hepatocelular e de lesão renal no sangue periférico.
3. Avaliar a resposta local ao diluente do antígeno

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Tipo de estudo e local

Estudo pré-clínico com modelo animal experimental *in vivo* realizado no biotério e centro de cirurgia experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (FM – UnB).

2.3.2 Amostra

Foram utilizados 30 camundongos isogênicos, fêmeas, espécie *Mus musculus*, linhagem C57BL/6, com aproximadamente 27g e 120 dias, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil, com atestado sanitário, transportados por via aérea, em caixas apropriadas.

A linhagem de animais escolhida apresenta suscetibilidade à infecção para diferentes espécies de *Leishmania* e desenvolve lesões cutâneas, bem como disseminam para órgãos como fígado, baço e linfonodos. São híbridos com uniformidade genética, permitindo respostas semelhantes entre os animais(294).

Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina (FM) da UnB, em ambiente controlado adequadamente por luminosidade, com ciclos de 12 horas no claro e 12 horas no escuro, para simular dia e noite, e com água e ração *ad libitum* durante o período de quarentena e por todo o período em que permaneceram alojados.

Os camundongos foram divididos em 5 grupos devidamente identificados com as letras de A a E, cada um composto por 6 animais, cada grupo dividido em duas caixas.

2.3.3 Intervenção e divisão dos grupos

Os grupos foram divididos da seguinte forma:

- A – Animais inoculados com solução salina estéril (SF 0,9%);
- B – Animais inoculados com o antígeno (0,1ml a 1:1);
- C – Animais inoculados com o antígeno (0,1ml a 1:10);
- D – Animais inoculados com o antígeno (0,1ml a 1:100);
- E – Animais inoculados com o antígeno (0,1ml a 1:1000);

2.3.4 Preparo de antígeno de *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/PH8

O antígeno usado na inoculação dos animais foi produzido pelo Instituto de biologia da Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil. Foram utilizadas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/PH8) preservadas no laboratório de Dermatocologia e identificadas por isoenzimas, PCR e anticorpos monoclonais. Uma quantidade de 5×10^7 promastigotas/mL foi semeada em 15 mL de meio Schneider com gentamicina 100ug/mL com 20% SFBi (soro fetal bovino). As células foram sedimentadas 2.000, 10 min, 25 °C. Foram lavadas duas vezes com PBS estéril 2.000xg, 10 min, 25 °C. Foi ressuspenso o sedimento em água milliQ estéril para uma concentração de 5×10^8 promastigotas/mL (foi adicionado 1,4 mL). O seguinte procedimento foi repetido 3 (três) vezes: congelado por 30 min a -20 °C e descongelado por 30 min à temperatura ambiente. Foi acrescentado Triton X-100 0,3% e TLCK (T-7254 Sigma) para a concentração final de 10 uM. Em seguida o material foi centrifugado 2 (duas) vezes 16.000xg, por 10 min, a 4 °C e filtrado em filtro 0,22 uM, resultando em dois eppendorfs com 500 uL de extrato. A seguir foram retirados 50 uL e incubados em meio Schneider com gentamicina com 100ug/mL, 20% SFBi(soro fetal bovino inativado) meio, 27 °C, para verificar o crescimento de *Leishmanias*. Foi retirado e incubado em meio LB líquido, 37 °C, sob agitação 250 rpm, por 24h, para avaliar o crescimento de bactérias. Foram então retirados 50 uL e incubados em meio LB sólido a 37 °C, por 24h, para avaliar novamente crescimento de bactérias.

2.3.5 Aplicação do antígeno nos camundongos

Quando os animais completaram 150 dias de vida, foi realizada a epilação do dorso dos camundongos com creme depilatório humano da marca Veet®. Uma semana após (06/05/2020) o antígeno foi injetado intradermicamente dos dorsos dos

camundongos em localização 1 a 2cm proximal a cauda dos mesmos em região mediana, seguindo os grupos de divisão. O volume de aplicação foi de 0,1ml.

2.3.6 Observação das reações na pele após 48h

Com 48 após a inoculação do antígeno (08/05/2021), foi feita a observação desinstrumentada e busca de lesões tais como eritema, infiltração e pápulas na pele da região de aplicação do ALA na pele dos camundongos.

2.3.7 Coleta de amostras

Após 56 dias (03/06/2020) da aplicação do antígeno nos camundongos foi realizada a coleta de sangue para exames laboratoriais. Inicialmente os camundongos foram anestesiados com Quetamina e Xilasina realizada e punção cardíaca para coleta do sangue. Em seguida, foi realizado o sacrifício dos animais com o auxílio de um veterinário do biotério da UnB, seguindo os preceitos de ética animal. Posteriormente foi realizado o aspirado da linfa através de aspiração por agulha utilizando-se seringa de 1 ml com solução salina da região do local onde foi inoculado o antígeno. Após isso foi realizada biópsia do local para exame histopatológico e para reação em cadeia de polimerase (PCR).

2.3.8 Exames bioquímicos

Os exames bioquímicos realizados através do Laboratório Sabin com incentivo do Núcleo de Apoio à Pesquisa (NAP) foram dosagem de albumina (g/dL), bilirrubinas totais (mg/dL), bilirrubina direta e indireta (mg/dL), creatinina (mg/dL), fosfatase alcalina (U/L), γ -GT (U/L), transaminase glutâmico oxalacética - TGO (UI/L), transaminase glutâmico pirúvica - TGP (UI/L) e ureia (mg/dL) dos 30 camundongos.

Para compilação dos resultados bioquímicos, foi construído um código de identificação de cada camundongo, levando em consideração a aplicação de salina ou antígeno e as concentrações (1:1; 1:10; 1:100 e 1:1000), como descrito na Tabela a seguir (Quadro 4):

Quadro 4: Código de identificação dos camundongos-

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
SAL	SAL	ALA	ALA	ALA	ALA	ALA	ALA	ALA	ALA
		1:1	1:1	1:10	1:10	1:100	1:100	1:1000	1:1000

101	204	307	410	513A	616A	719A10	822A10	925A10	1028A10
S	S	A1	A1	10	10	0	0	00	00
102	205	308	411	514A	617A	720A10	823A10	926A10	1029A10
S	S	A1	A1	10	10	0	0	00	00
103	206	309	412	515A	618A	721A10	824A10	927A10	1030A10
S	S	A1	A1	10	10	0	0	00	00

Legenda: Código: Número da caixa (1 a 10) – Número do camundongo (01 a 30) – Salina (S) ou Antígeno (A) – Concentração do Antígeno (1:1; 1:10; 1:100; 1:1000). Abreviaturas: Caixa (C). Antígeno da L. (L.) amazonensis (ALA). Salina (SAL).

2.3.9 Cultura de leishmania

O aspirado do local realizado de acordo com o descrito no item 2.2.7 foi imediatamente injetado em meio McNeal, Novy e Nicolle (NNN), sendo realizado um meio de cultura para cada animal, totalizando 30 meios de cultura. Os meios foram incubados a 24 °C em estufa do laboratório de dermatomicologia da faculdade de medicina/UnB sendo realizada leitura semanal através de microscópio de luz invertida até completar um mês.

2.3.10 Exame Histopatológico

Em seguida, após o sacrifício dos animais, foi realizada a coleta de fragmento da pele do dorso dos animais. O fragmento de pele foi inicialmente fixado em formol a 10% permanecendo por 21 dias neste meio sendo então emblocado e incluído em parafina no laboratório de patologia do Hospital Universitário de Brasília. Foram então sendo confeccionadas 30 lâminas, uma de cada camundongo. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E) e a leitura foi realizada de forma cega por 2 patologistas.

2.3.11 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a realização da reação em cadeia da polimerase, as amostras colhidas do local de inoculação do ALA no dorso de cada camundongo foram epiladas manualmente e colocadas separadamente em 30 *ependorfs* e foram adicionados 180µl de *digestion buffer* e 20µl de proteinase K em cada amostra, certificando a completa imersão do tecido na mistura de *buffer*. As amostras foram deixadas em banho-maria a 55°C por 13 horas, com agitação ocasional até a lise estar completa. Em seguida, para remover quaisquer materiais particulados, o lizado foi centrifugado na velocidade máxima por 3 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi em seguida transferido para um novo e estéril tubo de microcentrífuga. Então, foram

adicionados 20µl de RNase-A ao lizado, misturando bem por agitação em vórtice e incubando em temperatura ambiente por 2 minutos. Na sequência, foram adicionados 200µl de *binding buffer* e misturado bem por agitação em vórtice. Em seguida, foram adicionados 200µl de etanol 96% ao lizado e misturado bem em vórtice por 5 segundos. Após esses procedimentos, se iniciou o passo-a-passo para ligação, lavagem, eluição e armazenamento do DNA para a realização da leitura em equipamento de PCR, seguindo os passos propostos pelo guia da PureLink® Genomic DNA Kits (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Inicialmente foi realizada reação em cadeia da polimerase SYBR Green qPCR tendo como alvo as sequências do kDNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia* utilizando os seguintes primers, 5'-GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC-3' and 5'-GGG GTA GGG GCGTTC TGC GAA-3', resultando em um produto amplificado de 77 bp, sendo feita a análise da curva de dissociação(295).

Também foi realizada reação em cadeia da polimerase qualitativa em tempo real (PCR) com T reagentes específicos de *L. (V.) braziliensis* foram usados, a saber, os iniciadores 5' = -TGCTATAAAATCGTACCACCCGACA-3' = e 5' = -GAACGGGGTTTCTGTATGCCATTT-3' =, e a sonda FAM-TTGCAGACCCGGCAGACCC FAM, 6-carboxifluoresceína; TAMRA, 6-carboxitetrametilrodamina), resultando em um produto amplificado de 83 pb(244).

Ambas as reações foram realizadas no QuantStudio 1 (Thermo Fisher Scientific), conforme descrito por Gomes et al(244).

2.3.11 Princípios Éticos

Foi seguida a Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO, 1978) e princípios éticos para experimentação animal (COBEA, 1991) e Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UnB, sob o protocolo n.º 52/2019.

2.3.12 Análises estatísticas

Foi utilizado o *software* Excel 2016 para a confecção dos bancos de dados, cálculo de porcentagens e para confecção de tabelas.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Observação do local de inoculação do ALA

Após a aplicação do creme depilatório no local da inoculação do ALA, ocorreram escoriações leves na pele de dois animais da amostra estudada. A aplicação do antígeno foi realizada somente após uma semana quando regressão completa das lesões já havia ocorrido. Com 48 horas da aplicação do ALA no dorso dos animais, foi realizada a observação desinstrumentada da região de aplicação do ALA, que não apresentou em nenhum dos animais do estudo quaisquer sinais clínicos de positividade da infecção por LTA, tais como eritema, infiltração e/ou pápulas.

2.4.2 Exames bioquímicos para estudo dos efeitos adversos

Para análise dos efeitos adversos da aplicação do ALA nos modelos animais, os resultados dos exames bioquímicos foram compilados na tabela abaixo (Tabela 3), seguindo o código de identificação supracitado no Quadro 4.

Tabela 3- Resultados dos exames bioquímicos realizados nos camundongos por grupo

	Controle	1:1000	1:100	1:10	1:1
Albumina g/dL	3.38 (0.56)	2.9 (0.17)	3 (0.14)	3.27 (0.39)	3.27 (0.47)
Bilirrubina Total - mg/L	0.84 (0.47)	0.77 (0.68)	0.43 (0.21)	0.54 (0.19)	0.82 (0.67)
Bilirrubina Direta - mg/L	0.5 (0.28)	0.58 (0.7)	0.18 (0.11)	0.4 (0.18)	0.36 (0.26)
Bilirrubina Indireta - mg/L	0.34 (0.26)	0.18 (0.016)	0.25 (0.19)	0.14 (0.05)	0.46 (0.43)
Creatinina - mg/dL	0.27 (0.1)	0.2 (0)	0.27 (0.1)	0.27 (0.10)	0.3 (0.11)
FAL U/L	86.67 (49.83)	114.16 (68.44)	88.83 (20.01)	84 (26.06)	84 (19.88)
γ-GT U/L	3.16 (1.6)	2.67 (0.81)	4.83 (2.99)	5.2 (3.27)	4.5 (3.78)
TGO UI/L	201.6 (87.94)	268.17 (224.39)	225.67 (109.26)	178.8 (62.53)	219.67 (131.38)
TGP UI/L	39.8 (6.23)	30.16 (13.52)	34 (10.31)	31.6 (7.7)	40 (10.75)
Ureia mg/dL	66.17 (13.4)	61 (11.69)	59.83 (7.25)	68.5 (15.15)	61.5 (9.79)

Tabela 4: Valores de referência de exames laboratoriais para camundongos B57BL/6 encontrados na literatura. †referência Spinelli 2012(296), e ‡ Almeida 2008(297).

Marcadores bioquímicos

Valores de referência

Albumina (g/dL)	5.00±2.45†
Bilirrubina Total (mg/dL)	0.88±0.26†
Creatinina (mg/dL)	1.61±0.18†
TGO (U/L)	43.60±0.26†
TGP (U/L)	37.00±21.37†
Ureia (mg/dL)	41.74±5.99†
Fosfatase Alcalina (U/l)	210,43-323,57‡

Três camundongos do grupo total (103S, 410A1 e 617A10) não tiveram todos os marcadores bioquímicos analisados por insuficiência da amostra coletada, segundo o laboratório de análise. Para evitar erros na compilação gráfica, seus resultados foram desconsiderados e a média foi obtida desconsiderando esses camundongos do total da amostra.

2.4.3 Aspirado da lesão e cultura

Na avaliação parasitológica realizada das culturas de aspirado das lesões, 30 dias após o semeio, não foi evidenciado crescimento de *Leishmanias* em nenhum dos meios de cultura.

2.4.4 Exame histopatológico

A análise histopatológica dos fragmentos coletados de 29 camundongos mostrou um discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob a epiderme, permeado por edema, com ausência de formação de granulomas e ausência de parasitos (Tabela 5). Entretanto, o camundongo 616A10 apresentou moderado infiltrado inflamatório linfocítico na derme, permeado por raros polimorfonucleares e acompanhado por edema, sem formação de granulomas, com a presença de histiócitos e vesículas contendo raras formas amastigotas ovaladas, reconhecíveis pelo núcleo excêntrico pequeno e com presença do cinetoplasto, concluindo o diagnóstico parasitológico de infecção por *Leishmania spp*, em padrão de reação inflamatória exsudativa crônica (Figuras 27 e 28). Um dos camundongos apresentou reação natureza cicatricial com edema e discreto infiltrado inflamatório linfocitário (Figura 29).

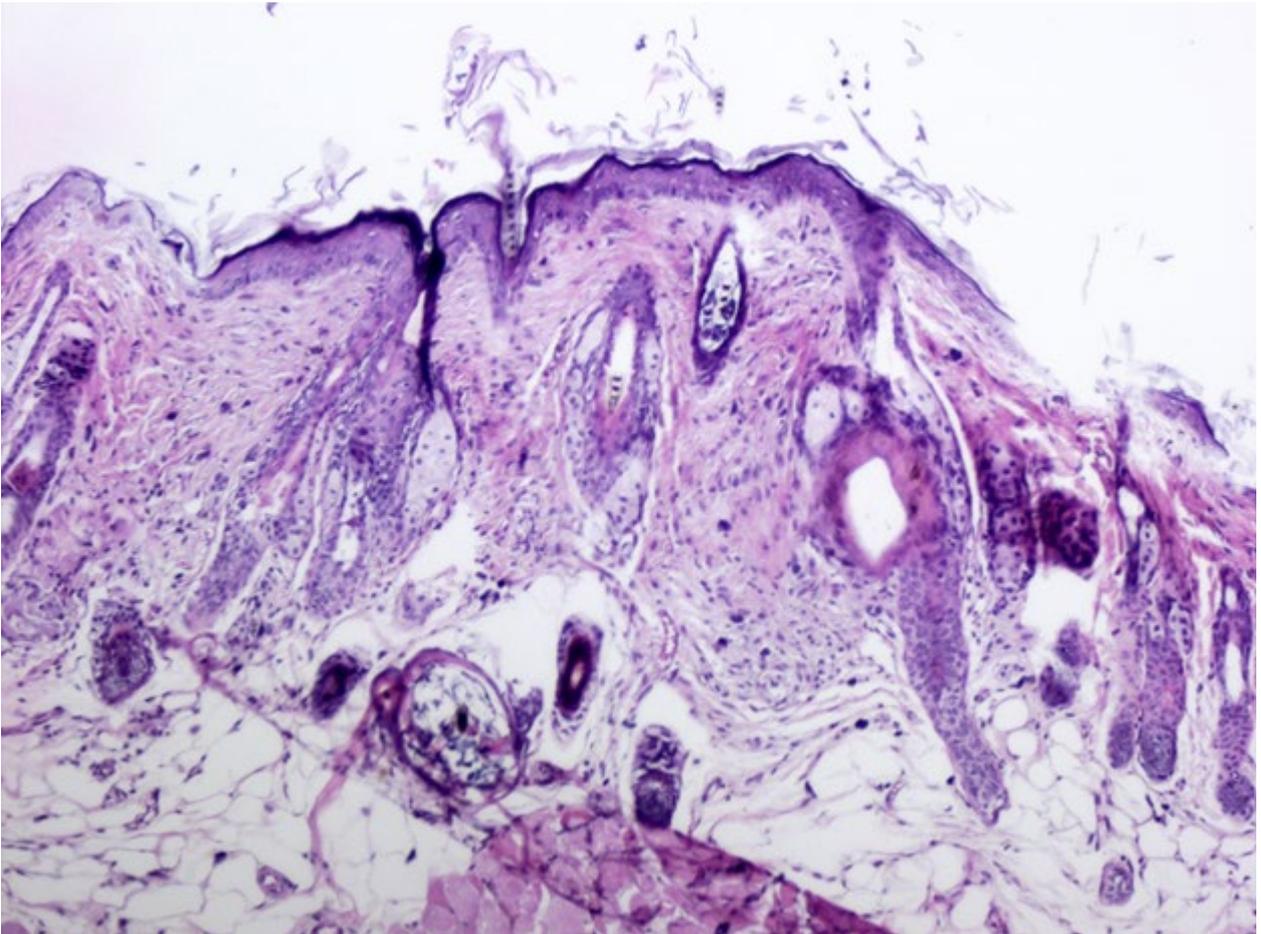


Figura 27- Exame histopatológico Camundongo 616A10 preparo H&E, x20- Infiltrado inflamatório linfohistiocitário intersticial com raros neutrófilos sem a formação de granulomas- padrão de reação inflamatória exsudativa crônica.

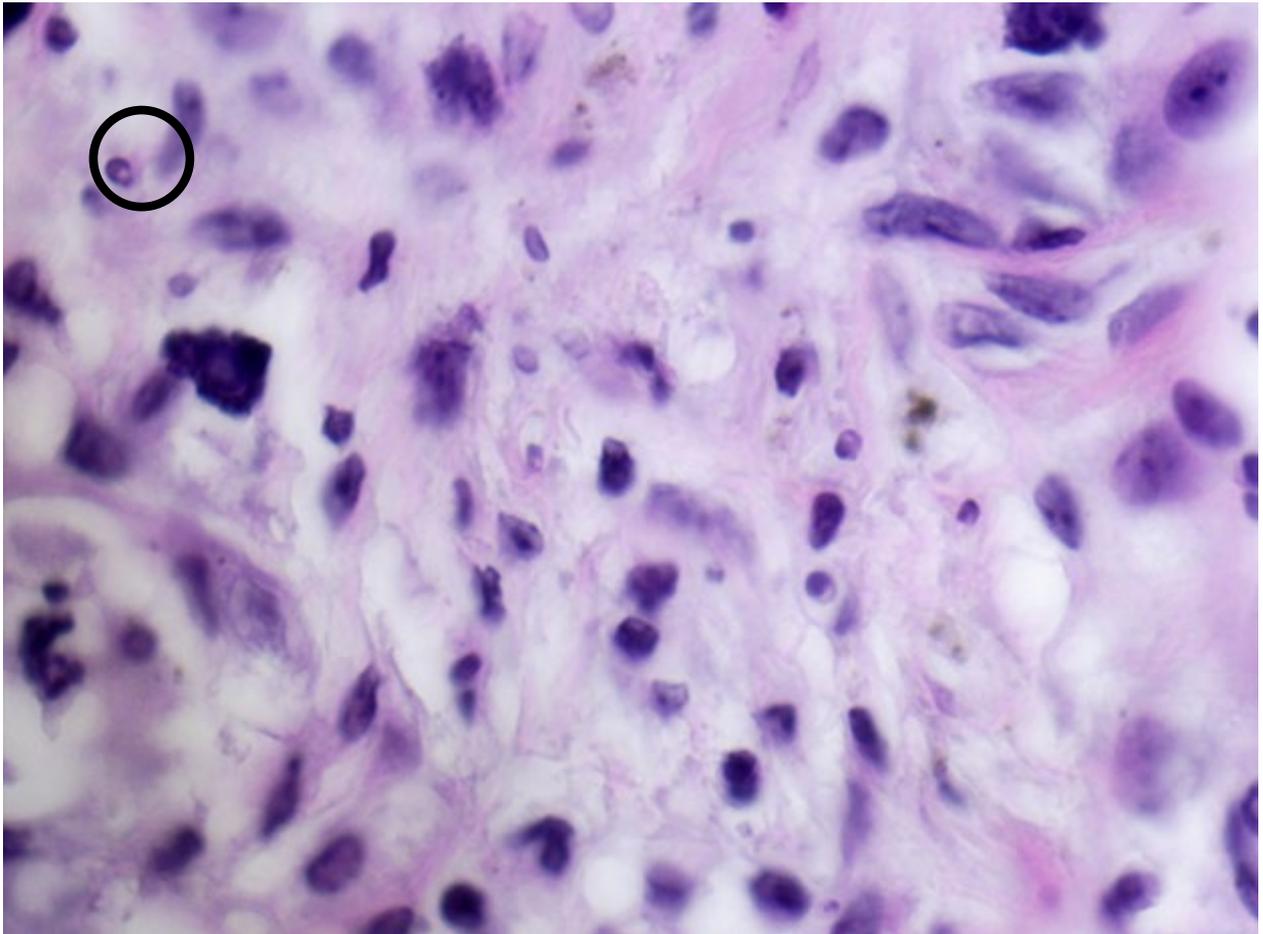


Figura 28- Exame histopatológico Camundongo 616A10 preparado com óleo de imersão H&E, x100-
Círculo preto- amastigota na derme.

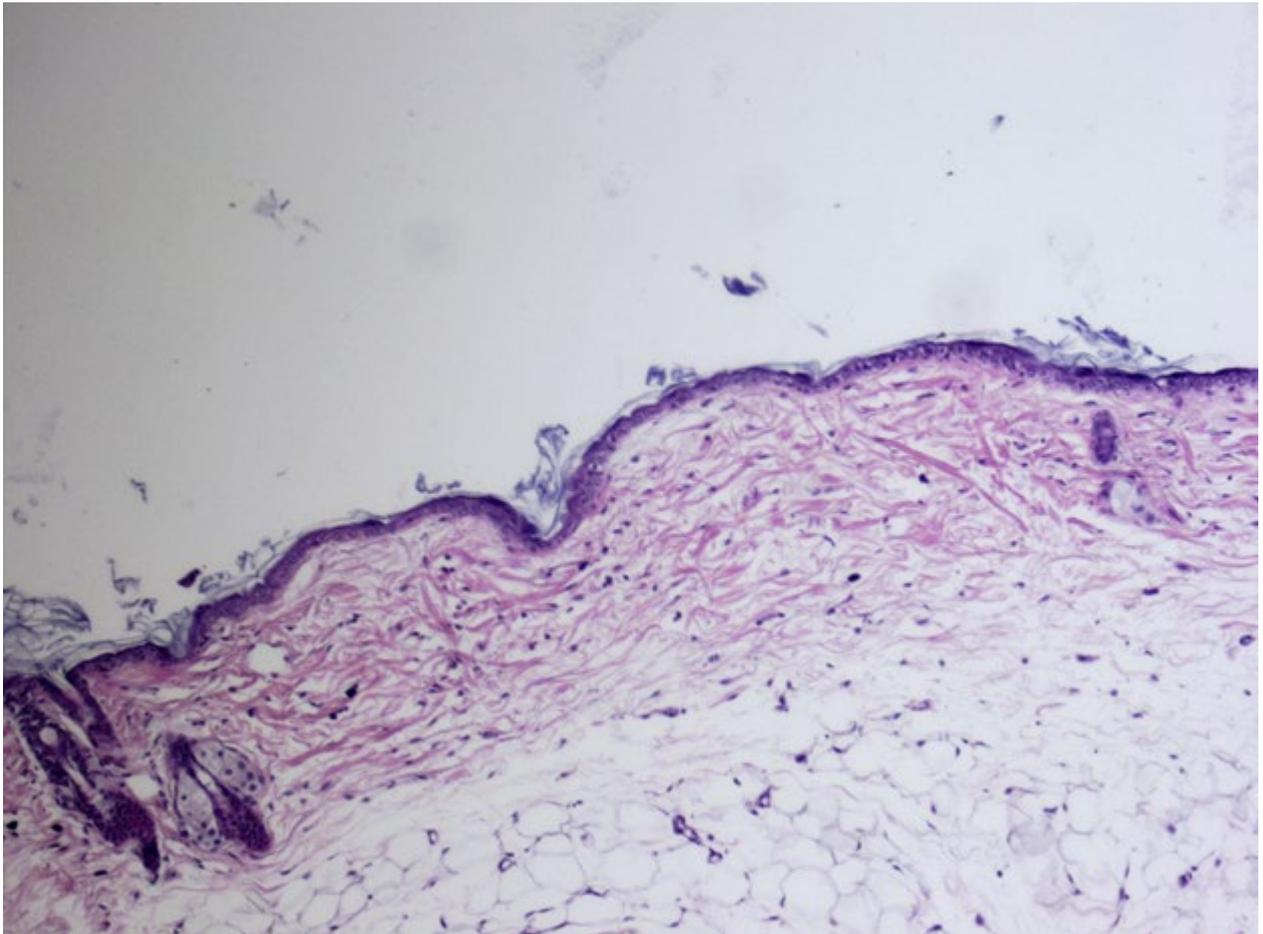


Figura 29- Exame histopatológico camundongo 719A100- Epiderme retificada e infiltrado linfocitário na derme associada a fibrose sugestivo de cicatriz H&E x20

Tabela 5- Resultados dos exames bioquímicos realizados nos camundongos

Código do animal	Número de fragmentos	Microscopia	Granuloma	Parasitas	Método de coloração
101S	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
102S	3	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
103S	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E, GIEMSA
204S	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
205S	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E, GIEMSA
206S	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
307A1	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E, GIEMSA
308A1	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
309A1	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
410A1	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
411A1	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
412A1	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
513A10	3	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
514A10	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
515A10	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E, GIEMSA
616A10	2	Sob epiderme regularmente acantótica há moderado infiltrado inflamatório linfocitário, permeado por raros polimorfonucleares e acompanhado por edema. Não há formação de granulomas. Notam-se no interior de alguns histiócitos vesículas contendo raras formas amastigotas ovaladas, reconhecíveis pelo núcleo excêntrico pequeno e com presença do cinetoplasto. Conclusão: Leishmaniose Tegumentar Americana, em padrão de reação inflamatória exsudativa crônica.	Ausente	Presente	H&E, GIEMSA
617A10	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
618A10	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
719A100		Reação de natureza cicatricial com edema e discreto infiltrado inflamatório linfocitário.	Ausente	Ausente	H&E, GIEMSA

720A100	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
721A100	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E, GIEMSA
822A100	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
823A100	3	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E, GIEMSA
824A100	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
925A1000	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
926A1000	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
927A1000	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
1028A1000	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
1029A1000	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E
1030A1000	2	Discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema.	Ausente	Ausente	H&E

2.4.4 PCR

Foi realizada reação em cadeia da polimerase com os marcadores SYBR GREEN sendo notada amplificação de produto em dois camundongos do grupo controle, que foi interpretada como possível amplificação inespecífica ou dímeros de primer. Realizada nova PCR com primers e probe Taqman, sendo todos negativos.

2.5 DISCUSSÃO

Apesar da grande importância da IDRM para o diagnóstico da LTA, a utilização desta apresenta algumas dificuldades. Entre elas está a produção de um antígeno padronizado o que dificulta a interpretação do teste (166), sendo que variações sutis no antígeno utilizado podem resultar em performance diferente(167). Outra dificuldade decorre do fato que o antígeno é de difícil produção em grande escala, com a necessidade de cultura do parasito(166, 168, 169). Utilizamos o antígeno derivado de *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/PH8 neste estudo. Apesar de existirem diferenças na resposta a antígenos derivados de diferentes espécies tanto em humanos(298) quando em animais(299), o antígeno de *L. (L.) amazonensis* tem sido utilizado amplamente em estudos devido ao seu rápido crescimento e as reações cruzadas com a *L. (V.) braziliensis* (159). Ele produz reações de hipersensibilidade retardada satisfatórias em pacientes com lesões por esta Leishmania(300). Além disso, a *L. (V.) braziliensis* é de difícil isolamento e cultivo(83, 301) o que dificultaria a sua produção para estudo futuro em humanos bem como sua padronização, que é essencial para estudos de sua acurácia diagnóstica(166). Desta forma, entendemos que a escolha da *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/PH8 foi adequada levando em conta a sua produção e padronização para uso em futuros estudos em humanos.

Escolhemos camundongos B57BL/6 para a inoculação do antígeno. Apesar de existirem diferenças na resposta imunológica entre as diversas linhagens de

camundongos(302). A maioria das linhagens apresentam susceptibilidade a *L. (L.) amazonensis* apresentando-se com lesão primária progressiva e lesões metastáticas múltiplas(303). Em estudo com camundongos B57BL/6, Barral e cols mostraram que setenta dias após a infecção os camundongos tinham infiltrados com macrófagos associados à presença de *Leishmania* na histologia do local da lesão(304) e que 64 semanas após apresentavam lesões nasais semelhantes a LM.

A observação desinstrumentada da região de aplicação do ALA na pele dos camundongos após 48 horas da inoculação não evidenciou a presença de sinais como eritema, infiltração e pápulas. A apresentação clínica da IDRМ vai 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(11, 156). Em nosso estudo, entretanto, esperávamos não encontrar nenhuma reação clínica ao antígeno já que os camundongos não foram previamente expostos a *Leishmania* e qualquer reação poderia ser atribuída a reação de hipersensibilidade. A não observação de lesões, portanto, é uma característica interessante do antígeno já que reações de hipersensibilidade já foram descritas em outros estudos(13, 293).

A ausência de crescimento de *Leishmanias* nos meios de cultura feitos a partir do aspirado da linfa do local de aplicação do antígeno parece mostrar que nenhum camundongo apresentou *Leishmanias* vivas capazes de se multiplicar após a inoculação do ALA, parecendo demonstrar assim certa segurança do antígeno aplicado em não gerar infecção sistêmica nos animais. Além disso, não houve diferenças significativas entre os controles e os camundongos em que aplicamos o antígeno em relação aos exames laboratoriais solicitados. Isso sugere que as diferenças observadas com relação aos valores de referência sejam relacionadas a fatores peculiares do estudo que afetaram de forma semelhante todos os animais.

Outros estudos mostraram que a aplicação do antígeno de Montenegro é bastante segura. Em estudo com 400 sujeitos hígidos a aplicação do antígeno não produziu maiores taxas de eritema, edema que aplicação do veículo e não ocorreram casos de febre, dor local ou bolhas em nenhum dos participantes do estudo estudo(305). Resultados semelhantes foram reportados em estudo iraniano com 571 sujeitos *Leishmaniose* ativa ou curada. Neste, todas as reações adversas reportadas foram leves ou muito leves, sendo que em nenhum caso houve necessidade de tratamento da reação adversa ou qualquer prejuízo nas atividades da vida diária(306).

Em 29 dos camundongos estudados foi observado discreto infiltrado inflamatório linfocitário sob epiderme, permeado por edema na epiderme. Estudos histopatológicos mostraram que mesmo pacientes sem Leishmaniose podem apresentar infiltrado linfocitário no local a aplicação, entretanto com padrões morfológicos diferentes(307). 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(307). 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(308). Pacientes com IDRM positiva mais que não desenvolveram a doença apresentaram infiltrado com correlação positiva entre macrófagos e linfócitos T CD8+, já pacientes com infecções crônicas mostraram associação entre células T CD4+ e T CD8+(308). Em outro estudo, a reação no local de aplicação do antígeno de Montenegro de pacientes com LM tinha menos células de Langerhans que de pacientes com LC(149). Estudos prévios, portanto, mostram que pode haver infiltrado inflamatório o local de aplicação do antígeno mesmo em pacientes que, a princípio, não tiveram contato com a Leishmania. Por outro lado, não realizamos coloração por imuno-histoquímica nos camundongos deste caso, não sendo possível analisar melhor as características do infiltrado celular. Em um dos casos, além do infiltrado inflamatório linfocitário, foi observado epiderme retificada associada a fibrose. Atribuímos estes achados a reação ao creme depilatório que levou a escoriação local. Nestes 29 casos os padrões do infiltrado celular não estão entre os característicos da LTA como descrito por Magalhães(263) e o infiltrado inflamatório, por si só, não fala contra a segurança do antígeno.

Em um dos camundongos foi observada “Sob epiderme regularmente acantótica há moderado infiltrado inflamatório linfo-histiocítico, permeado por raros polimorfonucleares e acompanhado por edema. Não há formação de granulomas. Notam-se no interior de alguns histiócitos vesículas contendo raras formas amastigotas ovaladas, reconhecíveis pelo núcleo excêntrico pequeno e com presença do cinetoplasto. Conclusão: Leishmaniose Tegumentar Americana, em padrão de reação inflamatória exsudativa crônica.”. A Leishmaniose cutânea pode ser desencadeada por trauma(309, 310). O trauma da aplicação do antígeno poderia

reativar uma infecção por latente por *Leishmania*. Isso, entretanto, somente seria esperado caso os camundongos tivessem sido expostos previamente a *Leishmania spp*, o que não é esperado neste caso. Este achado, portanto, pode indicar que o antígeno produzido não foi seguro.

Com o objetivo de confirmar a presença de *leishmania* no caso estudado uma opção seria realizar a reação em cadeia da polimerase para a pesquisa de *L. (L.) amazonensis*. Utilizamos método baseado em SYBR, já que ele é capaz de amplificar alvo molecular desta espécie de *Leishmania*. Observamos, entretanto, a presença de amplificação em dois camundongos do Grupo controle não sendo possível afirmar que esta amplificação foi devida a presença de dímeros de primer ou amplificação inespecífica. Apesar de mais baratos e de terem a possibilidade de identificar a espécie, os ensaios de PCR em tempo real baseados em SYBR podem levar à amplificação inespecífica ou a dímeros de primer(311). Geralmente é possível diferenciar estas duas situações utilizando a curva de dissociação, sendo que a temperatura de dissociação vai depender do conteúdo de CG, da sequência de bases nitrogenadas e da extensão do amplicon(246). No caso, entretanto, esta diferenciação não foi possível, o que inviabilizou a interpretação dos resultados neste caso. Levando em conta tratar-se de um estudo de segurança, entendemos que o antígeno produzido foi inadequado para a realização de testes em humanos e deveremos revisar os métodos laboratoriais para novo teste em animais. Para descartar possível contaminação por *Leishmanias* do subgênero *Viannia* realizamos uma reação em cadeia da polimerase com probe Taqman. Esta reação não foi positiva em nenhum dos camundongos.

A dificuldade de realização da IDRM foi entendida inicialmente como um potencial obstáculo ao recrutamento dos pacientes para o estudo. A IDRM é utilizada principalmente para diagnóstico(26). Contudo, a sensibilidade deste teste é bastante variável na literatura. Na maior parte dos estudos entre 89-98% dos doentes tem o teste positivo(75, 312-315). Em estudo realizado em área de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, entretanto, apenas 77% dos doentes apresentaram positividade na IDRM(316). 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(317). Resultados semelhantes foram obtidos em outro estudo no qual a IDRM teve sensibilidade de 75% para lesões agudas

e de 93,3% para lesões crônicas, a especificidade, entretanto, foi semelhante entre os grupos(318).

A IDRM tem papel fundamental no manejo da Leishmaniose tegumentar por apresentar características complementares aos exames parasitológicos, tendo maior positividade em formas crônicas, geralmente acima de 90% (75, 312-315). Em estudo realizado no HUB-UnB observamos que o teste é 90% sensível para casos de LTA com PCR negativo. A alta sensibilidade deste teste mesmo em casos com baixa carga parasitária é fundamental no diagnóstico de LTA em casos crônicos da doença onde os exames moleculares podem ser negativos(12). Em nosso estudo incluímos pacientes com tempo de evolução da doença e com a forma cutânea, que são sabidamente associados a maior sensibilidade dos testes parasitológicos(319). Além disso, temos acesso à reação em cadeia da polimerase para o diagnóstico que, apesar da variação, tem sensibilidade de entre 90% e 100% para a LC(13, 208, 219). Desta forma, apesar da indisponibilidade da IDRM a partir de 2019 pudemos concluir os estudos, apresentados nos capítulos 3 e 4.

2.6 CONCLUSÕES

2.6.1 Geral

O antígeno utilizado provocou possível infecção por leishmania em um dos camundongos indicando que não é possível o seu uso em estudos clínicos, devendo a metodologia de sua produção ser reavaliada.

2.6.2 Específicas

- 1- Foi demonstrada possível infecção por Leishmania em um dos camundongos associada a infiltrado histopatológico compatível. Evidências clínicas e histopatológicas de infecção por Leishmania não foram demonstradas nos demais camundongos.
- 2- Não foram evidenciados sinais de toxicidade hepática ou renal nos camundongos estudados.
- 3- Não foram observadas reações clínicas compatíveis com hipersensibilidade aos diluentes do teste.

CAPÍTULO 3 A PRESENÇA DE DNA DE *L. (V.) BRAZILIENSIS* NA MUCOSA NASAL DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA E A BUSCA DE POSSÍVEIS PADRÕES CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS DE PROGRESSÃO DA DOENÇA: UM ESTUDO TRANSVERSAL

3.1. INTRODUÇÃO

A LM é resultante da disseminação de parasitos de um quadro de LC(132, 284). Isso desencadeia uma intensa resposta imune dependente da ativação do macrófago(320-322). Essa intensa reação celular é responsável pelo desenvolvimento de lesões granulomatosas nas estruturas septo nasal e orofaríngea(322) e também reduz a quantidade de parasitos em estágios tardios dificultando o diagnóstico da doença (148).

Uma das grandes limitações dos estudos observacionais é a presença de variáveis confundidoras (323) e já é bem descrito na literatura a possibilidade de variáveis como sexo (324, 325), local da lesão (324-326) e tempo de exposição ao antígeno(321, 327) estarem associadas a patogênese da Leishmaniose. A história natural da LM mostra que existe um possível paradoxo relacionado à imunologia. Embora a presença da *Leishmania* na mucosa ao longo do tempo estimule uma resposta granulomatosa intensa, mais cedo na progressão da doença, o parasito escapa da resposta imunológica hospedeira durante os períodos de disseminação para a mucosa (328-330). Para o melhor estudo da fisiopatogênese da LM é, portanto, importante levar em conta a dinâmica da disseminação do parasito e sua relação com a resposta imune através do tempo. Por este motivo, procuramos contextualizar aqui não somente aspectos fisiopatológicos relacionados a disseminação e a resposta imunológica, mas também questões metodológicas que nos permitam considerar as mudanças que ocorrem na interação parasito hospedeiro ao longo do tempo.

3.1.1 A disseminação da *Leishmania* para a mucosa nasal

Infelizmente estudos específicos sobre *L. (V.) braziliensis* são escassos, existindo mais vasta literatura sobre outras espécies de *Leishmania* e outros protozoários. Uma limitação é que detalhes do ciclo de vida da *Leishmania spp* podem ser diferentes a depender da espécie do parasito e do hospedeiro levando a consequências com relação ao desfecho da doença e a tecidos acometidos(331), desta forma os dados de literatura devem ser interpretados com cautela.

De forma geral o ciclo se inicia quando o vetor flebotomíneo pica a pele e ao se alimentar no sangue periféricos injeta formas promastigotas metacíclicas da *Leishmania spp* (332-334). A partir de então a forma promastigota pode entrar na corrente sanguínea ou infectar as células da pele da região da picada(335). Para espécies que causam a forma visceral admite-se que a disseminação ocorre logo após a picada do flebótomo e juntamente com a proliferação do parasito(336). Os mecanismos por traz da disseminação tem sido limitados por falta de modelos animais adequados para seu estudo(336). Em estudo que infectou camundongos com *Plasmodium berghei*, Amino e cols demonstraram através de microscopia de epifluorescência de lapso de tempo que aproximadamente 50% dos esporozoítos deixam o local da picada em até uma hora, sendo que 70% por via hemática e 30% por via linfática(337). Não é possível, entretanto, extrapolar esta informação para a *Leishmania spp* já que estudo mostrou que, ao contrário dos esporozoítos de *Plasmodium*, promastigotas de *L. (L.) major* tem pouca mobilidade após a picada(338). Estudo com *L. (L.) donovani*, entretanto, mostrou que sua forma promastigota tem motilidade em contato com macrófagos de camundongos tendo esta importante papel fisiopatológico(339). É possível que detalhes do comportamento do parasito , como motilidade ao entrar em contato com o hospedeiro mamífero, possam variar não somente com relação a espécie como da cepa estudada já que existe variação intrínseca na capacidade de disseminação de diferentes populações de *Leishmania sp* dentro de uma mesma espécie(340). Com disseminação inicial, o protozoário passa por uma fase em que fica temporariamente preso em determinados órgãos como o fígado e baço, no caso de disseminação hematogênica, após a qual ele fica retido nos órgãos em que tem tropismo(341). Os principais mecanismos propostos para maior retenção e tropismo de espécies causadoras de LM na região nasal estão relacionados ao mecanismo filtrador dos capilares locais, a incapacidade de cartilagem septal de montar uma resposta imune adequada e da menor temperatura local(342). O fator temperatura é reforçado pelo crescimento preferencial de espécies causadoras de LTA em temperaturas próximas a 25 °C, enquanto espécies causadoras de Leishmaniose visceral tem capacidade de multiplicação mantida a temperaturas próximas a 36 °C(343). Isso é reforçado pela menor temperatura do septo nasal anterior, região mais comumente afetada

pela LM, que fica entre 25,3 °C (Vestíbulo nasal) e 29,8 °C (cabeça da concha média)(344).

3.1.2 A Imunopatogênese da Leishmaniose mucosa

3.1.2.1 Resposta imune inata.

Durante o primeiro contato com o hospedeiro a leishmania deve superar uma serie de mecanismos inatos do hospedeiro tanto constitutivos, como a barreira epitelial da pele e mucosas , como induzíveis: a cascata do complemento e outros componentes líticos séricos; hidrolases lisossômicas e espécies reativas de oxigênio produzidas por fagócitos mononucleares e os decorrentes de reconhecimento por receptores de padrões moleculares associados a patogênicos(do inglês: PAMPs)(345, 346). Estes receptores reconhecedores de padrões(do inglês PRRs) são codificados na linhagem germinativa sendo responsáveis por perceber a presença de microrganismos e fazem isso reconhecendo padrões moleculares conservados (347). As respostas imunes induzidas por estes receptores levam ao desenvolvimento, principalmente através da maturação de células dendríticas(348, 349), da resposta imune adaptativa(346), que será discutida mais a frente, a qual é centrada em linfócitos que contem receptores específicos gerados por recombinação somática(350, 351). Principais diferenças entre as respostas imunes inatas e adaptativas estão resumidas no Quadro 6(352).

Quadro 5: Principais diferenças entre os sistemas imunes inato e adaptativo

Propriedade	Sistema imune inato	Sistema Imune Adaptativo
Receptores	Fixos no genoma Rearranjo não necessário	Codificados em segmentos genéticos Rearranjo necessário
Distribuição	Não- Clonal Todas as células de uma classe são idênticas	Clonal Todas as células de uma classe diferentes
Reconhecimento	Padrões moleculares conservados (ácido lipoteicóico,	Detalhes da estrutura molecular (Proteínas, peptídeos e carboidratos)

	Lipopolisacarídeos, mananas e glicanas)	
Distinção moléculas próprias/ não próprias	Perfeita: selecionada durante o processo evolutivo	Imperfeita: Selecionada em algumas células somáticas
Tempo de ação	Ativação imediata dos efetores	Ativação retardada dos efetores
Resposta	Moléculas coestimulatórias Citocinas (IL-1 β e IL-6) Quimiocinas (IL-8)	Expansão clonal ou anergia IL-2 Citocinas Efetoras (IL-4, IFN- γ)

3.1.2.2 A via do complemento

A via do complemento é um conjunto de mais de 30 moléculas solúveis presentes no plasma que são responsáveis pela lise rápida de patógenos que invadem o corpo(353). O complemento é ativado por três vias clássicas(Figura 30), sendo elas convergem para a ativação de C3 mas se diferenciam de acordo com a natureza do reconhecimento(354). A via clássica do complemento é ativada por anticorpos, a via alternativa pela hidrólise espontânea do C3 associada a superfícies moleculares e a via da lecitina por padrões moleculares associados a patógenos (do inglês: PAMPS)(355). Embora exista debate sobre qual a via do complemento mais importante na resposta à Leishmaniose, existe evidência do envolvimento das três vias sendo a via clássica mais importante para o combate a promastigotas e a via alternativa para amastigotas(356).

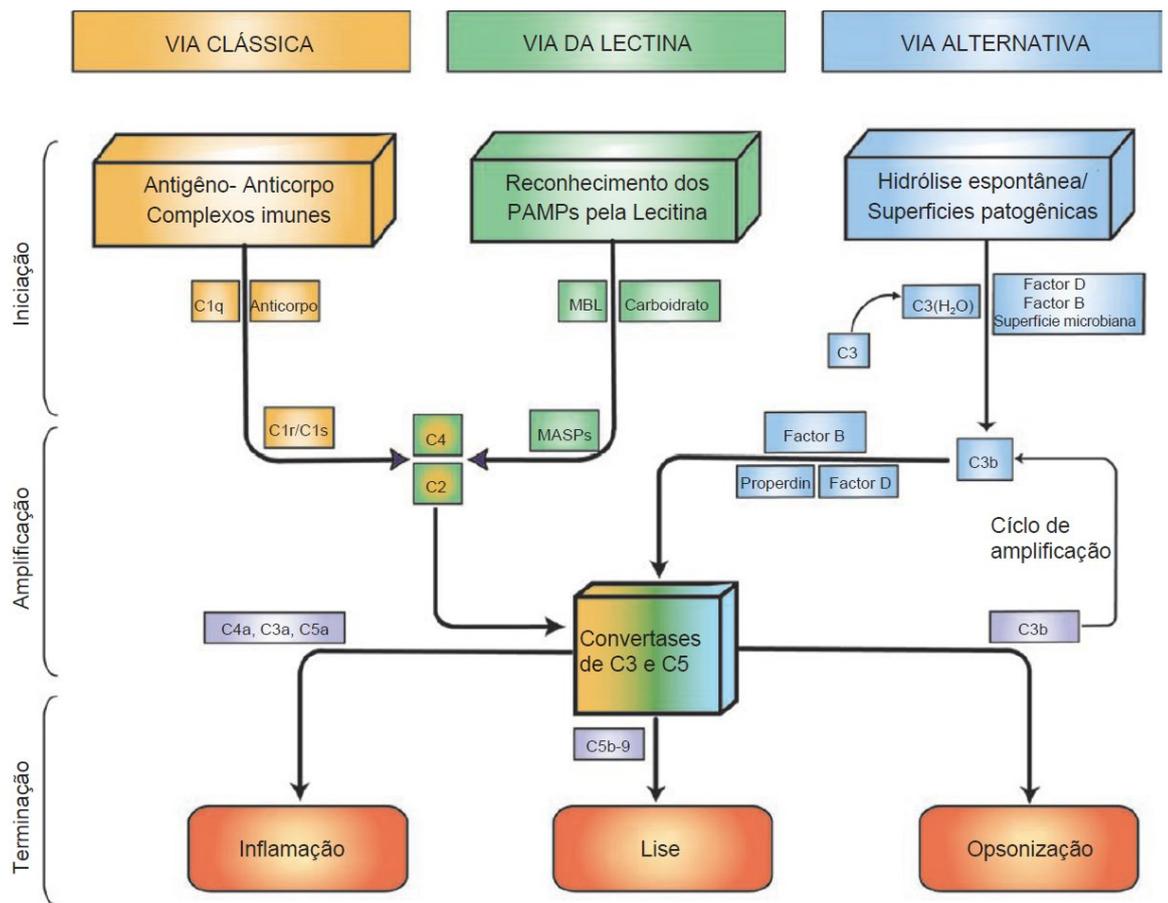


Figura 30- Vias do complemento- adaptado de Dunkelberguer 2010(353).

O complemento fornece uma primeira linha de defesa contra parasitos extracelulares que devem ser subvertidos para que a infecção prossiga(357). A via do complemento representa um importante mecanismo de combate a *Leishmania* no contato inicial do hospedeiro mamífero com a forma promastigota, sendo que 85-95% dos parasitos são mortos em 2,5min de contato com soro humano(358). Um dos principais mecanismos que o parasito emprega para se defender da lise por complemento é a adoção do estilo de vida intracelular(345). Além disso, formas promastigotas são recobertas por um glicocálix abundante em glicoconjugados, incluindo Lipofoglicana(do inglês: LPG), Proteofoglicana (do Inglês: PPG), a metaloproteinase GP63 e Lipídeos de Glicofosfatidilinositol (do inglês GPIs)(359). Estes componentes permitem que a *leishmania* evite a lise pelo complemento e podem facilitar sua entrada na célula (Figura 31). Isso é demonstrado em promastigotas de *L. (L.) major* em que a protease de superfície GP63 cliva o C3b ligado a membrana gerando uma molécula semelhante ao iC3b não só criando os

ligantes necessários para a fagocitose de promastigotas por macrófagos como prevenindo a produção de C5 convertase e posterior formação do complexo de ataque de membrana. Além disso, promastigotas de *L. (L.) major* deficientes em GP63 são mais sensíveis a lise pelo complemento e geram lesões de desenvolvimento mais lento e em camundongos Balb/C(360). A importância da GP63 também já foi demonstrada na *L. (V.) braziliensis* sendo que, espécies do subgênero *Viannia* contém mais cópias gene que codifica a GP63 (361). Alterações na composição de lipofosfoglicanos da parede também são importantes sendo que, na *L. (L.) major*, existem alterações estruturais nas moléculas entre as formas promastigotas procíclicas e metacíclicas com resistência a lise mediada por complemento (362). Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* também interagem com as proteínas reconhecedoras de padrão da via da lectina, incluindo lectina ligante de manose (do inglês: MBL), collectina 11(CL-11) e ficolinas(363).

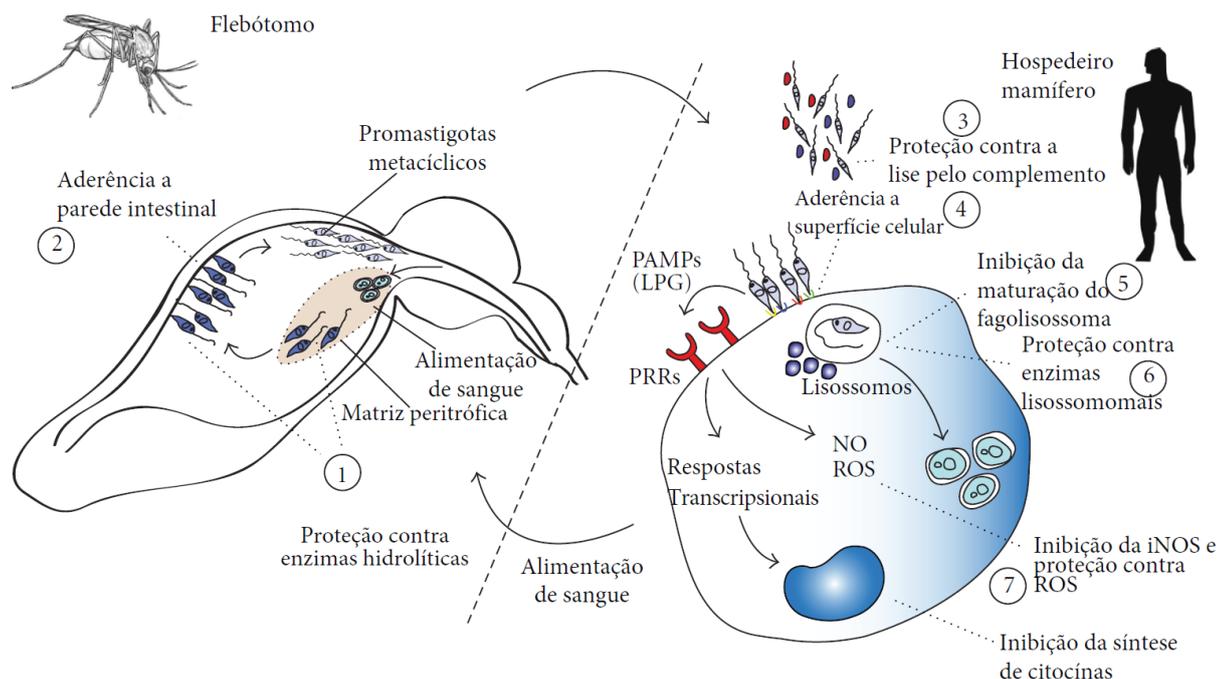


Figura 31- Funções dos LPG na virulência da *Leishmania*- PAMPs= do inglês, Padrões moleculares associados a patógenos; PRR= do inglês receptores de padrão; LPG= do inglês-Lipofosfoglicana; iNOS- Sintase de óxido nítrico induzível; ROS- Do inglês, Espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Fraco 2012 e cols(359)

3.1.2.3 Os receptores reconhecedores de padrão

Vários receptores reconhecedores de padrão (do Inglês: PRR) têm sido estudados como mediadores da entrada da *Leishmania sp* na célula (357, 364). As principais famílias de PRR identificadas são os receptores *toll like* (do inglês- TLR), receptores tipo de lecitina tipo C (do inglês: CLRs), os genes indutores de ácido retinóico – I (do inglês- RIG-I) e os receptores NOD-like (NLR). Tanto os TLR como os CLRs são receptores transmembrana, já os NLRs e os RIG-I são proteínas presentes no citosol (347). Apesar do conhecimento ainda muito limitado sobre estes receptores (356), já é estabelecido que os TLR fazem parte do controle da maturação de células dendríticas com produção de citocinas (356, 365). Diversos estudos *in vivo* demonstram que esta ativação é fundamental para a geração de resposta imune protetora (366) e que a interferência neste processo tem papel fisiopatológico na Leishmaniose (329, 367).

Os TLR reconhecem polímeros preservados em uma variedade de microorganismos patogênicos e estão presentes na membrana plasmática ou membranas internas de macrófagos, células dendríticas, e linfócitos T, B e NK (364). Os protozoários não têm boa parte destes polímeros reconhecidos pelos TLR mas algumas moléculas presentes na *Leishmania spp* já foram identificadas como estimuladoras de TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 (368-370).

É sugerida uma alteração no padrão de expressão destas moléculas na LTA, sendo que estudos sugerem que os TLR2, TLR4, TLR9 são menos expressos em células de Langerhans da epiderme (371). Um estudo por exemplo mostrou menor expressão de TLR4, mas maior de TLR2 na lesão do paciente com LC sendo o TLR9 foi mais presente no granuloma mas menos na epiderme (372, 373). Reforçando o possível papel fisiopatogênico do TLR2, outro estudo mostrou que camundongos que não expressam esta molécula, são mais resistentes a infecção por *L. (V.) brasiliensis* e demonstram maior ativação de células dendríticas com produção de IL-12 (374).

O papel do TLR3 tem sido alvo de muito debate na literatura sendo sua expressão associada a quadro atípico com grande quantidade de macrófagos ativado CD68+ e a presença de citocinas inflamatórias IL-8 e IL-1 β (375). Estudo com camundongos mostrou que Leishmanias infectadas 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(369). 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(376). É importante esclarecer, entretanto, que a importância do LVR1 na patogênese da LTA ainda não está completamente elucidada (377, 378).

Outro receptor possivelmente implicado é o TLR4. Em estudo in vitro com macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 mostrou que as LPGs de promastigotas causadoras de LM tiveram menor capacidade de estimular a produção de IL-12, IL-6, IL-1 β e TNF- α , sendo que a diferença desaparecia em camundongos TLR4KO(379). Estas citocinas estão entre as principais ligações entre a resposta imune inata e a adaptativa levando a inflamação com aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de células inflamatórias e indução da produção de proteínas de fase aguda(347, 351, 380, 381). O autor argumenta que outras moléculas como GP63, GIPLs e PPGs seriam mais importantes que a LPGs na LM, já que a LGS do isolado causador de LM teve baixo potencial pro inflamatório(379). Em estudo de imunohistoquímica de pacientes com LC, entretanto, o TLR2 se mostrou mais importante que o TLR4 na doença ativa(372).

3.1.2.4 O estabelecimento do parasito no meio intracelular

Ao se estabelecer no tecido ocorre fagocitose do parasito por células do hospedeiro sendo que a *Leishmania spp* pode infectar(382) uma variedade de células como fibroblastos(383), células dendríticas(384), macrófagos(384) e neutrófilos(338). Nas fases iniciais da infecção predomina a fagocitose por neutrófilos com macrófagos sendo progressivamente mais importantes com o tempo(338). A fagocitose é relativamente rápida podendo se completar em 10 a 20 minutos após a adesão(339). Após a fagocitose entre os principais mecanismos empregados pelo fagócito para destruição da *Leishmania* estão a produção de óxido nítrico(ON) e de espécies reativas de oxigênio (ROS) (385). Com a mudança de ambiente, do vetor para o hospedeiro mamífero, e com fagocitose, ocorrem mudanças na temperatura, Ph e suprimento nutricional que estimulam a transformação da forma promastigota para a amastigota sendo que o processo se completa em 25h-120hs(332).

3.1.2.5 Estabelecimento no hospedeiro e os modelos da resposta Imune Adaptativa

A eliminação da *Leishmania*, entretanto, necessita do desenvolvimento de resposta imune adaptativa com a apresentação de antígenos parasitários para células T(386). Os linfócitos T tem papel central em orquestrar a resposta imune de mamíferos(387). A compreensão de como esta resposta se processa, entretanto, sofreu grandes transformações ao longo do tempo(387). Até a década de 1970 predominava o conceito que as células T poderiam ser divididas segundo seus marcadores de superfície(387). A partir de 1973, entretanto, 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(387, 388). 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(387, 389, 390). Com o tempo foram identificados outros padrões de resposta de células T como as Th17 e Treg(391).

O desenvolvimento de diferenciação da resposta imune adaptativa, entretanto, depende não somente da apresentação de antígenos como também da presença de citocinas e de um sinal coestimulatório da célula apresentadora, sendo este chamado de paradigma dos três sinais para o controle inato da resposta imune adaptativa(382, 392). A coestimulação é o segundo sinal dado pela célula apresentadora e em sua ausência ocorre falha do desenvolvimento das funções efetoras e baixa capacidade proliferativa da células T(393). O sinal coestimulatório, entretanto, tem pouca função na diferenciação das células T em classes(394). Desta forma as citocinas teciduais são as principais responsáveis pela diferenciação das células T em nas subclasses necessárias para o combate a um determinado patógeno(382), sendo que a IL-12, IL-4 e IL-6 são as principais responsáveis por dirigir a diferenciação de células Th1, Th2 e Th17 respectivamente(364, 395, 396).

O paradigma Th1 versus Th2 não é completamente capaz de explicar a fisiopatogênia das diferentes formas clínicas da Leishmaniose(Figura 32). A LM, 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(158, 320). 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(397), 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 LM(398). Uma implicação importante achada está no fato de que a pentoxifilina, fraco inibidor do TNF- α , é eficaz como coadjuvante no tratamento da LM e reduziu os níveis de TNF- α na mucosa após o tratamento(399, 400).

A resposta imune Th17 através da IL-17 com diapedese de neutrófilos e liberação de proteínase também foi sugerida como importante na lesão tecidual da LM(401), sendo que lesões mucosas apresentam maior quantidade de neutrófilos que as de LC(402). Além disso, tanto a IL-17 como citocinas indutoras da resposta Th17(IL-1 β , IL-23, IL-6 e TGF- β) estão aumentadas na mucosa de pacientes com LM(401).

A resposta inflamatória exacerbada ocasionada pelas células T CD8+ também é um ponto importante da patogênese da LM(145). Em pacientes com LC ocorre progressiva acumulação de linfócitos T CD8+ com a esta maior número de células produtoras de granzima A(403). Além disso, linfócitos de sangue periférico de pacientes com LM apresentam maior citotoxicidade que os de pacientes com LC(404). A recorrência de LM também foi associada a presença na mucosa de maior quantidade de células citotóxicas T CD8+ e NK(405). Além disso, a presença de LT CD8+ foi associada a negatividade na IDRM de Montenegro, e esta, a falha terapêutica em um estudo(406). A *L. (V.) braziliensis* foi incapaz de induzir doença em camundongos deficientes em perforina mostrando indicando o papel imunopatogênico dos linfócitos T CD8+(407).

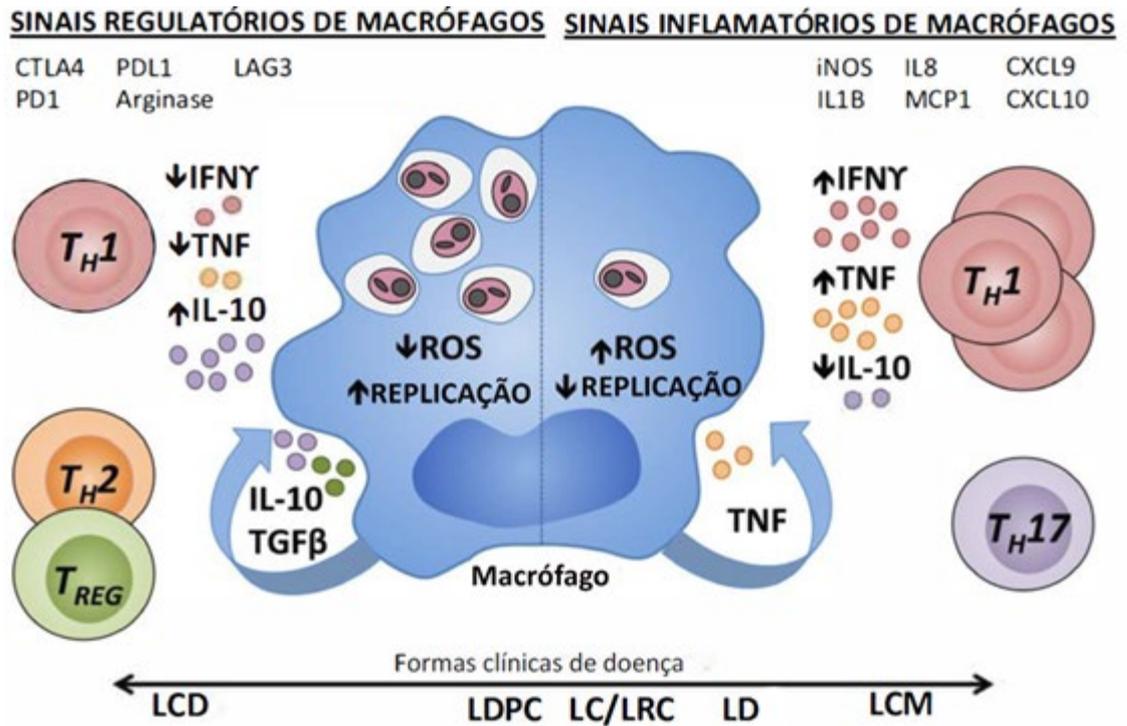


Figura 32: Papel dos macrófagos nos diferentes estados patogênicos durante a infecção por *Leishmania*. Os macrófagos humanos parasitados por *Leishmania* spp. são sujeitos a regulação por citocinas presentes na pele e no local da infecção. Citocinas inflamatórias do tipo 1, IFN- γ e TNF- α , podem sinergicamente 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) têm 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. Além disso, pacientes que não tiveram recidiva de LM tiveram maiores expressão tecidual de IL-10, mostrando a importância de seu papel regulador(405). Receptores inibitórios em células CD8 $^{+}$ e CD4 $^{+}$ (PD-1, CTLA-4, LAG3) e seus contra ligantes (CD80, CD86, PD-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; **LDPC**: Leishmaniose dérmica pós calazar; **LC**: Leishmaniose cutânea localizada; **LR**: Leishmaniose residivans cútis;

LD: Leishmaniose disseminada; **LCM:** 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(408)

3.1.3 Os métodos para estudo da resposta imunológica

A contagem de células, mensuração de mediadores solúveis ou de superfície celular são das opções mais comuns para avaliação da resposta imune(409). Entre os componentes solúveis mais comumente utilizados para a avaliação desta resposta estão as citocinas(410). De maneira simplificada as citocinas poderiam ser definidas como os “Hormônios” do sistema imune constituindo-se por fatores solúveis produzidos por uma célula tendo ação em outras células. Várias citocinas, entretanto, não se encaixam nesta definição podendo ter ação autócrina, endócrina, parácrina ou justacrina(411).

A mensuração de citocinas em diferentes compartimentos tem sido utilizada para a análise da função imune não somente em doenças infecciosas como a Leishmaniose(412), como também em doenças osteoarticulares(413, 414), cardiovasculares(415), neurológicas(416), oftalmológicas(417), otorrinolaringológicas(418, 419), pulmonares(420, 421) e outras(422). Devido a seu papel na imunidade efetora a os níveis destas moléculas podem ser usados como biomarcadores do processo patológico(423) podendo ser utilizados para analisar características da doença como etiologia, diagnóstico, classificação, estadiamento, susceptibilidade, avaliação de risco, prognóstico e resposta terapêutica(424). Esta análise deve levar em conta não só o compartimento corporal em que tais citocinas foram mensuradas como também os métodos utilizados para esta mensuração(423).

A expressão de mRNA de citocinas de interesse pode ser realizada por reação em cadeia da polimerase(425, 426), sua presença em uma célula específica pode ser realizada por citometria de fluxo em células permeabilizadas(427, 428) ou em fragmentos de tecido por imuno-histoquímica(429). Existe também uma pletera de métodos para a mensuração de citocinas nos mais diversos compartimentos incluindo “Protein microarrays”, cromatografia líquida e ensaios sanduiche com

anticorpos incluindo ELISA e o método citométrico de Esferas(CBA)(423). Além disso, para a correta interpretação dos níveis de citocinas é preciso existir padronização não só nos métodos de análise como os de coleta incluindo período do dia e tubos de coleta. O armazenamento a -80 °C evitando longos períodos de congelamento ou ciclos de congelamento e descongelamento, também são recomendáveis(430).

As variações individuais devem ser consideradas sendo que fatores como sexo, idade, condições nutricionais e ambientais também podem afetar de forma diferente os níveis teciduais de uma determinada citocina(431-433). Outros fatores que adicionam complexidade a interpretação são as fontes celulares e os tecidos em que tais citocinas são medidas (Quadro 6) adaptado de LIU 2021(434).

Quadro 6- Características das citocinas estudadas

Citocina	Tipo de citocina	Fontes celulares	Meia Vida	Funções biológicas	Concentrações [pg ml ⁻¹] em diferentes fluidos corporais in vitro					Referências	LDT [pg ml ⁻¹]
					Soro	Plasma	Saliva	Lágrima	Fezes		
IL-1β	Pró-inflamatória	Monócitos e macrófagos	21 min	Principal mediadora sistêmica dos efeitos da IL-1; ela afeta a expressão gênica da IL-6	-	1±1.2	1.5-5.3 × 10 ²	10 ² ± 2.8	-	(435-440)	7.2
IL-6	Pró e anti-inflamatória	Linfócitos T e B, monócitos, fibroblastos, células endoteliais, e algumas células tumorais	15.5 horas	Indução de respostas de fase aguda assim como respostas imunes específicas celulares e humorais Inibição da produção de TNF e IL-1 por macrófagos	8.6-14	22 ± 8.6	0-27	1.3 × 10 ² ± 12	0.3 ± 0.1	(435-437, 439-444)	2.5
IL-8	Pró – inflamatória	Monócitos, macrófagos, Células endoteliais, Células epiteliais, Hepatócitos, Condrócitos, células Tumorais	24 min	Mediadores pró inflamatórios que orquestram o recrutamento de leucócitos para os locais de inflamação	24-36	9.4±3.7	0.4-3.2 ×10 ²	-	-	(436, 439-442)	3.6
IL-12	Pró-inflamatória	Células fagocíticas, dendríticas e da Microglia	-	Diferenciação de células Th, síntese de TNF-α e IFN-γ	20-56	1.2×10 ² ±8.6	0-7.6	47	-	(433, 436, 437, 440, 441)	1.9
IL-10	Anti-inflamatória	Monócitos, Macrófagos, células T (Th2) e células B	-	Inibição de produção de citocinas por monócitos/macrófago e neutrófilos e inibição de respostas Th1 semelhante	8.5-17	38± 2.1	0-10	37±0.9	-	(436, 437, 440, 441, 445)	3.3
TNF-α	Pró inflamatória	Macrófago, Mastócitos, células de musculo liso vasculares, Linfócitos T e B	18.2 min	Pró-Inflamatória, ativação de neutrófilos, reabsorção óssea, anticoagulante, necrose tumoral, estimulação de moléculas de adesão	28-38	5.9 ± 0.4	0 – 5.8	4.8 ± 3.3	1.8 ± 0.3	(435, 437, 440, 441, 444, 446, 447)	3.7

* Tabela modificada da referência LIU 2021(434) sendo colocadas somente as citocinas aqui analisadas. Os limites de detecção teórico foram retirados do "Human Inflammatory Cytokines Kit Instruction Manual" pg 25. As duas variáveis que permaneceram no modelo final IL-6 e IL-12 tiveram todos os valores acima dos limites de detecção teórico. LDT= limite de detecção teórico

Uma outra forma interessante de estudar a função imune são os testes imunes funcionais. Eles consistem em analisar a resposta de um grupo de células imunes a um estímulo específico(410). A resposta ao antígeno pode ser avaliada de diversas formas como a habilidade das células para proliferar utilizando o teste de incorporação da 3H-timidina, pela mensuração de citocinas, pela expressão de marcadores de superfície celular ou ainda avaliar funções efetoras como a citotoxicidade(448). A interpretação dos resultados vai, portanto, depender em grande parte do estímulo utilizado no teste sendo que enquanto mitógenos vão

estimular tanto linfócitos virgens quanto efetores/ de memória, a utilização de um antígeno objetiva estimular linfócitos efetores/de memória antígeno específicos(449). Desta forma, a resposta ao antígeno vai depender em grande parte da memória imunológica associada a resposta imune adaptativa(410). A interpretação dos testes imunes funcionais na Leishmaniose pode ser, por vezes, desafiador, sendo que existem variações nas respostas imunes a antígenos de diferentes espécies de Leishmania e até mesmo dentro de uma mesma espécie causando diferentes síndromes clínicas(298, 379, 450). Outra limitação destes testes é que eles não são capazes de mimetizar completamente as interações célula a célula que ocorrem em um tecido específico e tão pouco a presença de órgãos linfoides existentes in vivo(451-454).

Outra opção para o estudo da resposta imune são os modelos animais podendo estes, superar algumas das limitações existentes em testes in vitro, sendo que eles tem sido utilizados com muita frequência(452). Na Leishmaniose, a imunopatogênese de isolados causadores de diferentes formas clínicas incluindo associados a LM tem sido estudado em modelos primatas e murinos(299, 455-457). Além da vantagem de se poder controlar parâmetros da infecção como tempo, quantidade e cepa de parasito a ser utilizada, existem modelos animais com inatividade de genes específicos que podem ajudar no estudo da função imune(328, 458). É importante entender, entretanto, que dados animais tem valor limitado no entendimento da função imune em humanos(449, 459) associado a baixa reprodutividade(460), e que isso pode ter consequências desastrosas(461).

3.1.4 Fatores de confusão

Nem sempre uma associação vista entre duas variáveis em um estudo observacional causal, ou seja, uma variável sendo causa da outra. Uma das grandes razões de uma associação é a presença de um fator de confusão. Este ocorre, pois, pacientes com certas características tendem a ter certas exposições(462). Por exemplo, pode existir em uma determinada população a associação entre o hábito de tomar café e o desenvolvimento do câncer de pulmão. A associação vista, quem bebe café tem mais frequentemente câncer de pulmão, pode ser na realidade causada pelo fato de que quem bebe café também fuma mais(Figura 33). Neste caso não é o café que causa câncer, sendo a associação vista relacionada a um

fator de confusão. Como estudos da patogênese da Leishmaniose em humanos são observacionais a presença de fatores de confusão tem que ser considerada.

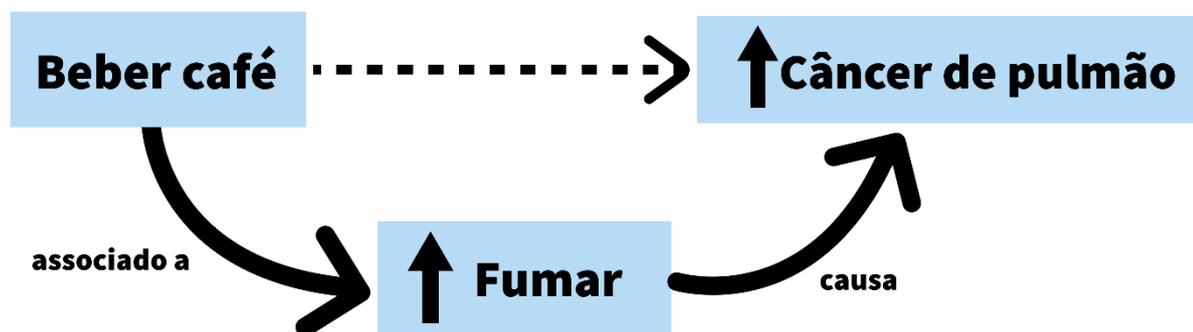


Figura 33: Explicando confundimento- A aparente associação ente beber café e câncer de pulmão é neste caso decorrente de um fator de confundimento, quem bebe café tende a fumar.

O desenvolvimento da Leishmaniose está relacionado ao caráter dinâmico da resposta imunitária associada ao tempo de exposição antigênica. Pacientes com LTA o maior curso da doença está relacionado a maior produção de IFN- γ e menor de IL-10 (327, 463, 464). Esta alteração imunitária vem acompanhada de uma redução da carga parasitária com o tempo(319) associada a alterações morfológicas com mais espongirose, maior formação de granulomas e maior presença de necrose(88). Diferenças entre as respostas imunitárias precoces e tardias podem explicar achados aparentemente contraditórios da literatura em que nas fases iniciais de seu desenvolvimento a LM poderia estar associada a menor produção de mediadores inflamatórios(465).

Isso está de acordo com o achado de que, em pacientes curados de LM, a duração da doença ativa está positivamente associada à produção de IFN- γ induzida por antígeno, mas negativamente associada à produção de IL-10(327). Ao contrário de modelos experimentais em que existe uniformidade no tempo de exposição antigênica e sabe-se com segurança o intervalo de tempo entre a infecção e a mensuração dos desfechos, estudos em humanos são marcados pela heterogeneidade e incerteza quando ao tempo de exposição(327). A covariável tempo de exposição pode ser, portanto, um fator confundidor nos estudos em humanos sendo que o aumento da homogeneidade da amostra através dos critérios de inclusão ou de análise multivariada são opções para melhor entender a relação entre as variáveis em situações de possível confundimento (323).

3.1.4.1 A utilização do desfecho substituto

Uma forma de uniformizar a variável tempo em estudos da patogênese da LM seria procurar os fatores de interesse no presente e acompanhar os pacientes para observar o desenvolvimento ou não de Leishmaniose mucosa. Uma dificuldade de realizar este tipo estudo é que em muitos pacientes as lesões cutâneas precedem em muito tempo a lesão mucosa, 37,5% cinco ou mais anos antes e 5,7% mais de 15 anos antes(132). Além da necessidade de acompanhar os pacientes por muito tempo, estudos como este necessitariam de incluir maior quantidade de pacientes antecipando perdas de seguimento. Ademais, as perdas observadas podem estar associadas ao desfecho ou a alguma das variáveis explicativas o que poderia induzir vieses no estudo(323). Adicionalmente, é eticamente impossível acompanhar sem tratar um paciente com LC até que ele desenvolva a forma mucosa. Outro aspecto é que, devido ao caráter dinâmico da LTA, é possível que um fator que seja importante em um estágio da doença não o seja em outro. Uma outra forma de uniformizar o tempo de exposição é a utilização de um desfecho substituto.

De acordo com Grimmes “Um desfecho substituto é uma medida de resultado que substitui o evento clínico de verdadeira importância. Também considerados “marcadores substitutos” ou “medidas intermediárias”, esses resultados são comumente medições de laboratório ou estudos de imagem que se acredita estarem envolvidos em o caminho causal para um evento clínico de interesse. Um exemplo seria a contagem de CD4 como substituto para a sobrevivência de pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) ou pressão arterial como um substituto para morbidade e mortalidade em pacientes que tomam anti-hipertensivos medicamento.”(466).

Com o objetivo de estudar alguns fatores clínicos e imunológicos possivelmente envolvidos na disseminação da Leishmania para a mucosa, etapa essencial da patogênese da LM, construímos um modelo multivariado para analisar o desfecho. Outra estratégia que utilizamos foi a utilização da variável intermediária “positividade do PCR na mucosa nasal” como desfecho objetivando obter maior uniformidade com relação a exposição do hospedeiro ao parasito.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO:

- Buscar no paciente com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) variáveis clínicas e imunológicas que possam estar relacionadas ao desfecho disseminação precoce da *L. (V.) braziliensis* para a mucosa nasal.

3.2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS:

1. Avaliar o perfil imunológico de pacientes com LTA, pela dosagem das citocinas IL-12, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 e IL-10 no sangue periférico, relacionando-o à presença do DNA de Leishmania na mucosa nasal.
2. Avaliar as variáveis clínicas e laboratoriais do hospedeiro associadas à presença do DNA de Leishmania na mucosa nasal, em pacientes com LTA.
3. Avaliar a prevalência de disseminação precoce de *L. (V.) braziliensis* para a mucosa nasal de pacientes com Leishmaniose tegumentar americana

3.3. MÉTODOS

3.3.1 CARACTERÍSTICA DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal onde os pacientes com suspeita de Leishmaniose cutânea, atendidos entre fevereiro de 2017 a dezembro de 2020 e que concordaram em participar voluntariamente da pesquisa, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram examinados para detecção da presença de DNA de *L. (V.) braziliensis* através da reação em cadeia da polimerase. Pacientes que não tiveram o diagnóstico de LTA confirmado foram excluídos do estudo. Foram colhidos os dados clínicos dos pacientes com Leishmaniose em ficha preparada com esta finalidade. Estes pacientes também foram submetidos à coleta de sangue periférico para dosagem das citocinas IL-12, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 e IL-10.

3.3.2 LOCAL DO ESTUDO

O recrutamento dos pacientes foi realizado no Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal. Trata-se de um serviço de referência, onde os pacientes são encaminhados de unidades básicas de saúde para confirmação diagnóstica, após suspeita clínica de LTA. O exame de Imunofluorescência indireta foi realizado no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal-LACEN-DF. Os exames de imprint, cultura e PCR das lesões foram realizados no Laboratório de Dermatomicologia, da Universidade de Brasília. A dosagem de citocinas foi realizada no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília através de citometria de fluxo por *Cytometric Beads Array* (CBA).

3.3.3 POPULAÇÃO ESTUDADA E DEFINIÇÃO DE CASO

Os dados aqui descritos referentes à população estudada e os exames realizados foram idênticos aos utilizados no estudo do capítulo 4(pg 135), exceto a dosagem de citocinas que é específica deste capítulo.

Inicialmente, pacientes com lesões cutâneas ativas sugestivas de Leishmaniose foram rastreados para inclusão, sendo coletados dados clínicos e laboratoriais de todos aqueles rastreados. Após investigação inicial foram excluídos pacientes que: 1- não tiveram o diagnóstico de Leishmaniose confirmado; 2- tiveram outro diagnóstico confirmado. Os pacientes incluídos foram divididos em dois grupos: 1 - Pacientes com a presença de DNA de *L. (V.) braziliensis* em mucosa nasal- Disseminação precoce (DP); 2 – Pacientes sem a presença de DNA de *Leishmania* na mucosa nasal- Controles (CT).

A definição de caso de LTA baseou se em critérios epidemiológicos, clínicos, laboratoriais parasitológicos e imunológicos, descritos em Gomes et al 2014 e de resposta com cura ao tratamento específico(13). LTA também foi confirmada pelo achado do parasito em cultura positiva, esfregaço com presença de amastigota, presença do parasito no exame histopatológico e detecção de DNA em reação em cadeia de polimerase. Também foram incluídos pacientes que tiveram exames compatíveis com melhora de lesões após tratamento.

3.3.4 EXAMES DIAGNÓSTICOS PARA CONFIRMAÇÃO DE LTA

Na consulta com a dermatologia foi realizada a inspeção das cavidades oral e nasal com auxílio da rinoscopia anterior e os pacientes foram encaminhados para avaliação pela otorrinolaringologia que realizou avaliação por nasofibroscopia, videolaringoscopia e videotoscopia. O diagnóstico de LTA foi baseado nos seguintes exames:

Imunológicos: imunofluorescência indireta e Intradermoreação de Montenegro

Parasitológico: cultura de aspirado da lesão em meio Neal, Novy, Nicolle (NNN); Imprint em lâmina de microscopia corada pelo Giemsa.

Exame histopatológico (HP) com as colorações Hematoxilina e Eosina; Giemsa; Ziehl-Neelsen; coloração pela prata.

Moleculares: PCR em fragmento de lesão de biópsia da lesão cutânea de e de swab nasal para a pesquisa de leishmania.

3.3.5 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Os dados clínicos e laboratoriais foram coletados com uso de instrumentos específico. Após a realização de exame endoscópico otorrinolaringológico os pacientes com lesões mucosas tiveram suas lesões estagiadas de acordo com classificação de Lessa(137). A disseminação do parasito para a mucosa foi avaliada por meio de coleta de material por swab nasal. O swab foi girado cinco vezes em cada fossa nasal no septo anterior e cabeça da concha inferior. A extração de DNA das amostras de swabs nasais foi realizada com o kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Reação em cadeia da polimerase qualitativa em tempo real (PCR) com TaqMan reagentes específicos de *L. (V.) braziliensis* foram usados, a saber, os iniciadores 5' = - TGCTATAAAATCGTACCACCCGACA-3' = e 5' = - GAACGGGGTTTCTGTATGCCATTT-3' =, e a sonda FAM-TTGCAGACCCGGCAGACCC FAM, 6-carboxifluoresceína; TAMRA, 6-carboxitetrametilrodamina), resultando em um produto amplificado de 83 pb(244). A reação foi realizada no QuantStudio 1 (Thermo Fisher Scientific), conforme descrito por Gomes et al(244). A Pesquisa de *L. (V.) braziliensis* no swab nasal foi o último procedimento a ser realizado, após todos os procedimentos diagnósticos e dosagem de citocinas.

Dosagem dos níveis de citocinas: o sangue foi obtido de cada paciente e o fator de necrose tumoral TNF- α , interleucina IL-10, IL-1 β , IL-8, IL-6 e IL-12p70 foram medidos no plasma usando o kit I de citocinas inflamatórias humanas para Matriz citométrica de esferas- (RUO) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) em um citômetro de fluxo FACS Verse (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

3.3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.3.6.1 Cálculo Amostral

Para efeito de cálculo amostral foram consideradas as diferenças de médias de TNF- α entre os grupos. As médias esperadas para os pacientes do grupo CT foram estimadas em 43.5 pg/ml com desvio padrão de 8.2 pg/ml baseados em dados de pacientes com LC obtidos por Da-cruz et al(412). Os valores para o grupo DP foram extrapolados de pacientes com LM a partir do mesmo estudo sendo a média de 231.4 pg/ml e o desvio padrão de 8.2 (412). Desta forma o número mínimo de sujeitos em cada grupo para obter a diferença desejada com alpha de 0,05 e poder de 0,9 seria de 5. Como se trata de um estudo transversal em que o número de sujeitos em cada grupo só seria conhecido após a análise de dados e de acordo com dados de Gomes e cols(467) apenas 11% dos pacientes com Leishmaniose cutânea tem PCR de swab nasal positivo para Leishmaniose seriam necessários 45.5 pacientes para termos o mínimo de 5 pacientes no grupo DP. Considerando que aproximadamente 50% dos pacientes rastreados para a inclusão não teriam o diagnóstico de LTA confirmado concluímos que seria necessário o rastreamento de 92 pacientes com suspeita para obtermos o resultado esperado.

3.3.6.2 Análise dos dados

Associação entre disseminação precoce e variáveis clínicas (sexo, idade, tempo de evolução das lesões, área total das lesões, número de lesões, número de segmentos corporais afetados, presença de sintomas mucosos e localização das lesões (pernas, braços, rosto ou pescoço e tórax ou abdômen) e os níveis de citocinas foram feitos usando o teste T de duas amostras para a variável paramétrica "Idade" e a soma dos ranks de Wilcoxon para todas as outras variáveis que se mostraram não paramétricas. Imputação por regressão usando a variável dependente e covariáveis significativas foi usada para estimar três valores ausentes

da área total das lesões. Todas as variáveis associadas a DP com $p < 0,25$ foram inicialmente incluídas no modelo multivariado. A análise multivariada foi feita com regressão de Poisson com variância robusta(468) e as variáveis foram escolhidas usando a estratégia de *stepwise backward selection*. A cada etapa, a melhoria do modelo foi avaliada pelo critério de informação Bayesiana. A multicolinearidade também foi avaliada por meio do fator de inflação da variância (VIF). Todas as análises estatísticas foram feitas no Stata Statistical Software Release 16 (College Station, TX: StataCorp LLC).

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Características básicas da população

Foram inicialmente recrutados 93 pacientes antes da realização de dos exames diagnósticos. Destes pacientes 9 foram excluídos porque o diagnóstico de Leishmaniose não foi confirmado e 5 porque tiveram outros diagnósticos confirmados(Figura 34). A média de idade foi de 41 anos sendo que a grande parte dos pacientes tinha lesão a aproximadamente dois meses e possuía apenas uma lesão cutânea. A média da área das lesões foi de 17.26cm^2 (Tabela 6). A maioria dos pacientes apresentava lesão em membro inferior 45 (56.9%), seguido de membros superiores 27 (34.1%), face e região cervical (13.92%) e finalmente tronco 8 (10.3%). Durante a investigação mais detalhada pela otorrinolaringologia foi verificada lesão compatível com LM em cinco pacientes do grupo DP (20,3%). Em todos estes pacientes a lesão era precoce pela classificação de Lessa(137) menor ou igual a II(Tabela 7).

Tabela 6- Características básicas da população

Variável	Média
Idade (anos), média (DP)	41.36(17.87)
Tempo de evolução das Lesões (meses), mediana (AIQ)	2(2)
Número de lesões cutâneas, mediana (AIQ)	1(1)
Soma das áreas das lesões cutâneas (cm^2)	17.26(16.74)
Sexo	
Masculino (%)	63 (50)
Feminino (%)	29 (36)

TNF= Fator de necrose tumoral; IL= interleucina; DP= Desvio padrão; AIQ= Amplitude interquartil.

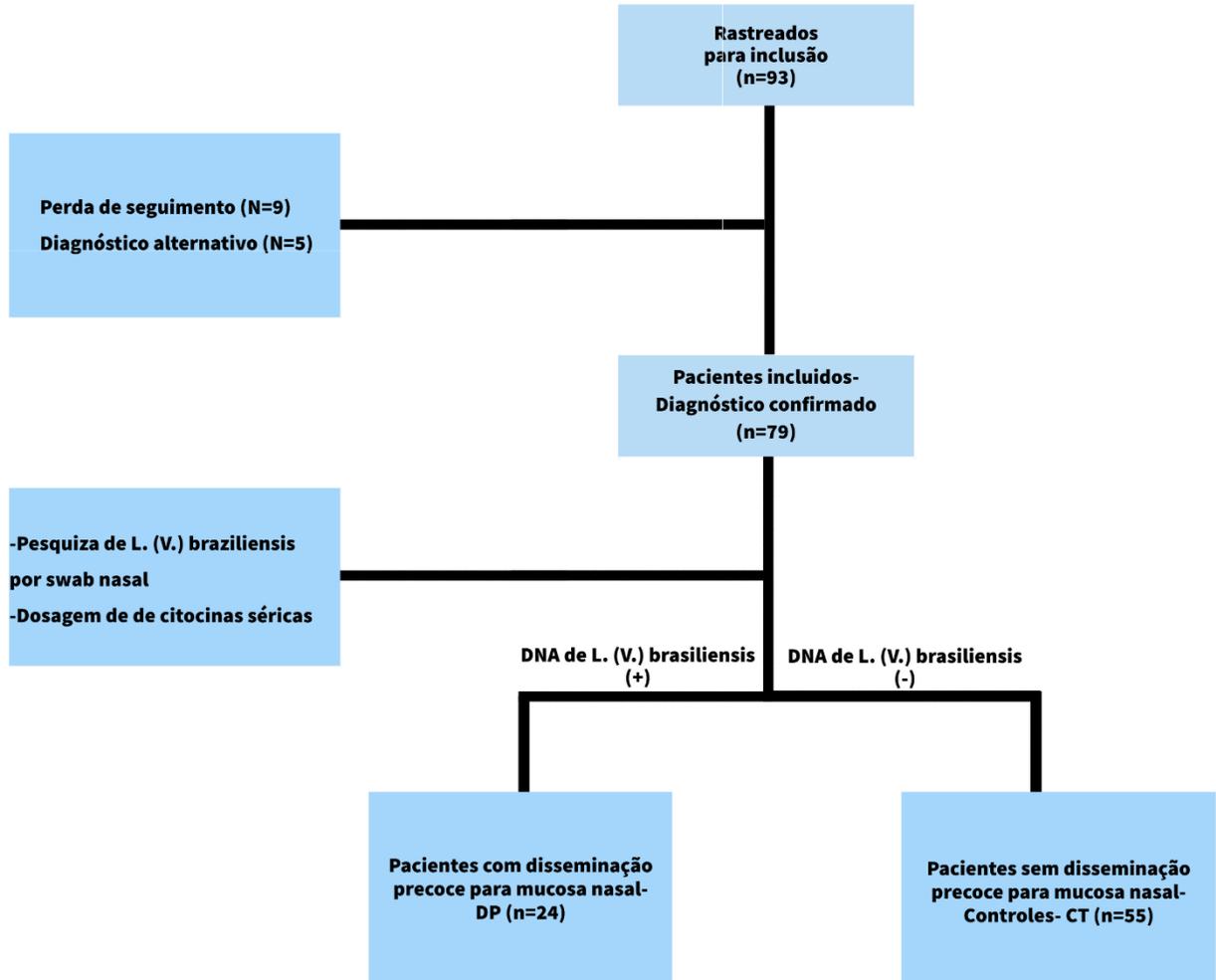


Figura 34- Fluxograma mostrando pacientes inicialmente rastreados e que preencheram os critérios de inclusão

Tabela 7: Pacientes que confirmaram Leishmaniose mucosa após investigação com otorrinolaringológica

		Classificação de Lessa (I-V)
PCT1	Crosta hemática em septo nasal e mucosa de corneto inferior edemaciada	II
PCT2	Pequenas áreas puntiformes de aspecto fiável em Mucosa septal	I*
PCT3	Lesão infiltrava em base da língua	I
PCT4	Crosta hemática em região de septo nasal a esquerda	II
PCT5	Lesões aftóides em palato duro e mucosa de septo nasal	II

*Superfície mucosa de coloração alterada que se mostrou friável a passagem do endoscópio nasal

3.4.2 Resultado da análise univariada

A disseminação precoce ocorreu em 30,3% dos pacientes com LC da população estudada. Na análise univariada disseminação precoce foi associada ao maior número de segmentos corporais acometidos ($p=0.0045$) e ao número de lesões ($p= 0.003$)(Tabela 8).

Tabela 8- Características da população por grupos
Controles

	Controles	Disseminação precoce	Valor de P
Idade(anos), média (DP)	42.65(17.63)	38.41(18.45)	0.17*
Tempo desde o início da doença (meses), mediana (AIQ)	2(2)	2(1.5)	0.87
Número de lesões (DP)	1.38(0.59)	11.87(39.15)	0.003
Número de segmentos corporais afetados, mediana (AIQ)	1(0)	1(1)	0.004
Área total das lesões	15.23(15.13)	21.69(18.62)	0.097
Sexo			
masculino (%)	35(63.6)	15(62.5)	1‡
feminino (%)	20(36.6)	9(37.5)	
Sintomas mucosos (%)	13(26.3)	7(29.17)	0.58‡
Lesões cutâneas nas pernas e quadril (%)	22(40)	12(50)	0.464‡
Lesões cutâneas em membros superiores (%)	16(29.09)	11(45.83)	0.198‡
Lesões cutâneas em tronco (%)	3(5.45)	5(20.83)	0.051‡
Lesões cutâneas na cabeça e pescoço (%)	5(9.09)	6(25)	0.08‡
Níveis de citocinas (pg/ml)			
IL-12 (DP)	4.09(2.88)	3.19(0.28)	0.17
TNF- α (DP)	7.93(11.7)	44.79(195.97)	0.24
IL-10 (DP)	3.21(2.1)	2.54(0.74)	0.39
IL-6 (DP)	15.98(41.6)	41.41(171.06)	0.17
IL-1 β (DP)	6.12(1.38)	6.06(2.22)	0.16
IL-8 (DP)	243.2(576.64)	421.08(1216.32)	0.85

TNF= Fator de necrose tumoral; IL= interleucina; DP= Desvio padrão; AIQ= Amplitude interquartil; *Pelo teste T de Student, ‡ Pelo teste de Fisher, demais variáveis pelo teste de soma de ranks de Wilcoxon.

3.4.3 Resultado da análise multivariada

No modelo multivariado também foram incluídas inicialmente as variáveis idade; tempo desde o início da doença; área total das lesões; presença de lesões nos braços, tórax e abdômen ou cabeça e pescoço; e os níveis de citocinas de IL-12, TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Foi encontrada alta multicolinearidade e o TNF- α foi retirado do modelo baseado no VIF 14.06 e seu maior valor de p no modelo univariado. Após a seleção das variáveis, as únicas que permaneceram no modelo foram os níveis de IL-12 Razão de Prevalências- RP = 0,44 (p = 0,034) (Intervalo de confiança- IC 95%: 0,21-0,94), níveis de IL-6 RP = 1.001 (p = 0,002) (IC 95%: 1,0005-1,002) e com número de segmentos corporais afetados PR= 1,65 (p <0,001) (IC 95%: 1,36-2,01).

3.5. DISCUSSÃO

3.5.1 As citocinas estudadas e a indução da resposta imune adaptativa

Foram dosados no soro o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina (IL)-10, IL-1 β , IL-8, IL-6 e IL-12p70. O desenvolvimento da resposta imune é complexo e passa por diferentes etapas desde a exposição ao antígeno até o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Para o entendimento dos achados do estudo é importante levar em conta o contexto do desenvolvimento da resposta imune adaptativa apresentado na introdução deste capítulo.

Em nosso estudo a IL-12 foi protetora contra a disseminação precoce de *L. (V.) braziliensis* para a mucosa nasal PR = 0,44 (p = 0,034; IC 95%: 0,21-0,94). A IL-12 é uma citocina classicamente associada ao desenvolvimento da resposta Th1(469) e como explicado, está entre as citocinas pró-inflamatórias associada ao desenvolvimento de LM (145, 470). O papel desta citocina vai depender do estágio da doença. Rocha e cols mostraram que pacientes com Leishmaniose cutânea inicial(< 2 meses) apresentam menor resposta proliferativa ao antígeno de *Leishmania* produzindo menor quantidade de IFN- γ e maior de IL-10. A resposta ao antígeno foi recuperada com a adição de IL-12 as culturas estimuladas(463). Em outro estudo mesmo grupo mostrou que a adição de anti-IL-12 à culturas de PBMC de pacientes com LM e LC não foi capaz de regular a produção de IFN- γ . O autor atribui este achado ao fato de que as células já estão diferenciadas para o fenótipo

Th1 não dependendo mais da ação da IL-12(321). Por atuar, portanto, na diferenciação da resposta Th1, a IL-12 parece ter papel mais importante nas fases iniciais da doença.

O papel protetor IL-12, por nós encontrado, parece contraditório, uma vez que a maioria dos estudos relacionou o desenvolvimento de LM com o papel pró-inflamatório da resposta Th1(158, 320, 471). No entanto, esse achado pode ser explicado pela escassez de estudos que abordem as etapas imunopatológicas iniciais que levam ao desenvolvimento de LM. Em um estudo transcriptômico com dez pacientes com LC, cinco dos quais desenvolveram ML, Maretti-Mira et al e cols sugeriram que os pacientes com tendência à doença da mucosa têm um desenvolvimento insuficiente ou retardado da resposta imune(465). Em concordância com o que achamos, outro estudo mostrou que em pacientes com LM apresentam menos células linfoides inatas do tipo 1 (ILC1) que tem características semelhantes as auxiliares Th1 sendo induzidas por IL-12 produzindo IFN- γ (472-474).

Adicionalmente, espécies causadoras de LM parecem alterar sua resposta ao estresse oxidativo favorecendo a disseminação inicial do parasito. O desenvolvimento na resposta imune oxidativa tem estreita relação com o desenvolvimento da resposta imune por parte do hospedeiro sendo o IFN- γ um dos fatores mais implicados(385). A virulência do parasito também está relacionada a resistência oxidativa intrínseca sendo que promastigotas de cepas causadoras de LM são mais resistentes ao óxido nítrico (ON) que as que causam apenas LC(328). No mesmo sentido Vieira e cols mostraram que promastigotas de isolado causador de LM também foi capaz de causar inibição da maturação e acidificação do fagossomo de uma forma dependente dos níveis de GP63(475) sendo que a LPG também parece inibir a maturação do fagossomo(364). Já em se tratando de formas amastigotas isso se inverte, sendo que, parasitos derivados de pacientes com LM, são menos resistentes ao ON que os derivados de pacientes com LC(476). Em conjunto estes dados mostram que se por um lado uma maior resistência das formas promastigotas poderia facilitar maior disseminação inicial, uma menor resistência das formas amastigotas causadoras de LM poderia facilitar o estabelecimento da Leishmania em outros tecidos por diminuir a estimulação imune no local da lesão inicial(328).

A IL-10 é uma das grandes regulatórias das repostas inflamatórias (404) sendo que estudos prévios já mostraram que pacientes com esta forma de Leishmaniose apresentam menor expressão de receptor de IL-10 nas lesões e que isso foi associado a maior expressão de Granzima A e IFN- γ em lesões(403). Desta forma na LM completamente desenvolvida esperamos que exista uma perda do papel regulatório da IL-10 diminuindo o controle sobre as repostas inflamatórias repostas imunes citotóxicas e Th1 levando a lesão tecidual. Não encontramos esta associação no estudo sendo que é possível que isso seja explicado pela dinâmica de sua expressão durante o curso da doença, como já discutido com relação aos níveis de IL-12.

As citocinas IL-6 e IL-1 β são potencialmente ligadas a fisiopatogênese da LM e por isso foram incluídas neste estudo. Como já explicado na introdução do capítulo estas citocinas têm papel na formação da resposta imune Th17. Estudo utilizando imuno-histoquímica mostrou que lesões de LM e LC que não responderam ao tratamento apresentam maior expressão da proteína AIM2 e de IL-1 β , embora a correção com IL-1 β não tenha sido significativa(477). Por outro lado, polimorfismo 174 C/G no gene da IL-6, que resultou em baixa expressão desta citocina tanto constitucionalmente como após a o estímulo com o antígeno de Leishmania, foi associado ao desenvolvimento de LM(478). O autor associa este desfecho a baixa capacidade dos pacientes regular a resposta imune Th2 pela produção de IL-6(478) em outros contextos a IL-6 tem possível papel pro inflamatório(406). Não foram achadas associações significativas do desfecho com os níveis de IL-1 β . Níveis mais altos de IL-6 foram significativamente associados com DP em nosso modelo multivariado final (RP = 1,001; p = 0,002). Embora a IL-6 tenha sido implicada no desenvolvimento de doença da mucosa(478), em nosso estudo, o tamanho do efeito (PR = 1,001; p = 0,002) foi pequeno comparado aos tamanhos de efeito das outras variáveis no modelo: IL-12, PR = 0,44 e número de segmentos corporais afetados, PR= 1,65.

Hipotetizamos que o desenvolvimento retardado da resposta imune protetora pode facilitar a disseminação do parasito e a exposição sistêmica crônica aos antígenos de Leishmania pode, por sua vez, levar à resposta imune inflamatória associada à doença da mucosa. Isso está de acordo com o achado de que, em pacientes curados de LM, a duração da doença ativa está positivamente associada à

produção de IFN- γ induzida por antígeno, mas negativamente associada à produção de IL-10(327). Podemos supor, por estudos animais, que o próprio local da lesão tenha papel no caso. Isso está de acordo com o achado de que em hamsters o local da lesão está associado a desfechos clínicos e imunológicos. Osório e Cols mostraram que hamsters infectados no focinho, em oposição a pata tiveram: evolução mais rápida e grave associada a mais necrose e infiltrado inflamatório nos tecidos e maior carga parasitária com menor resposta ao tratamento com drogas anti Leishmania. Do ponto de vista imunológico ainda apresentaram títulos mais elevados de anticorpos e menor resposta imunológica antígeno específica de células do baço(479). Assim a própria disseminação para a cavidade nasal associada poderia ser capaz de mudar o perfil imunológico destes pacientes para um padrão mais pró-inflamatório e ajudar a explicar os achados aparentemente contraditórios dos diferentes estudos.

3.5.2 O desfecho utilizado

Uma das grandes limitações dos estudos sobre os fatores causais da LM está em se comparar grupos de pacientes, os que desenvolveram ou não LM, com diferentes tempos de evolução(125). Neste estudo procuramos uniformizar o tempo de exposição entre os grupos através do uso de um desfecho substituto. Esta estratégia é interessante pois permite que os grupos sejam comparáveis com relação ao tempo de exposição ao antígeno e não a doença clínica em si. Isso é especialmente importante em estudos da imunologia da doença, já que, como explicado na introdução, a reação imune se processa desde o primeiro contato do parasito com o hospedeiro e não quando surge a lesão clínica. Ademais, variação entre os tempos de incubação das diferentes formas da doença, LM versus LC, podem fazer com que pacientes com a mesmo tempo de doença clínica tenham tempos de evolução bastante diferentes.

Como o surgimento da LM depende da disseminação de parasitos após lesão cutânea inicial (132, 284) entendemos que avaliar a presença de Leishmania na mucosa nasal de pacientes com LC está no caminho causal entre a infecção pela Leishmania e o desenvolvimento da LM, e, portanto, é uma interessante variável substitutiva. Por permitir a inclusão de pacientes no mesmo estágio de doença e com tempo de exposição à Leishmania semelhante o uso desta variável é capaz de

superar uma das limitações de boa parte dos estudos sobre patogênese e fatores de risco para a LM, o tempo de exposição ao parasito. A utilização da variável substituta, entretanto, também apresenta limitações que merecem ser aqui discutidas.

Poder-se-ia argumentar que LM seria causada por uma segunda infecção por outra *Leishmania*, o que enfraqueceria o desfecho substitutivo por nós utilizado. De acordo com a literatura, entretanto, disseminação do parasito a partir da lesão cutânea inicial é tida como o principal mecanismo para o desenvolvimento da LM(132, 284). Apesar de ser possível, é improvável que múltiplas infecções sejam a causa subjacente ao desenvolvimento da lesão mucosa. Um estudo de assinatura de kDNA de *L. (V.) braziliensis* mostrou que existe similaridade entre as lesões cutâneas e mucosas do mesmo paciente, sendo a variabilidade genética das lesões do mesmo paciente menos proeminente que a variabilidade entre diferentes pacientes(480). Isso sugere que os parasitos de lesões mucosas e cutâneas são de populações similares.

Outra possibilidade é que os parasitos se disseminem mais tardiamente no processo patológico, o que, poderia enfraquecer o uso da disseminação precoce como marcador de possível LM no futuro. Tem sido sugerido que amastigotas de pacientes com LM tem menor capacidade de ser internalizados e crescem mais lentamente que parasitos de pacientes com LC(476) e que promastigotas causadores LM são mais resistentes ao óxido nítrico(328). Isso sugere que parasitos que causam LM são transmitidos pelo vetor como promastigotas que são inicialmente mais resistentes com maior probabilidade de disseminação(328). Adicionalmente, as respostas imunes protetivas contra *L. (V.) braziliensis* são mais fracas no início do processo infeccioso(464) e após a exposição inicial à *Leishmania* a produção de anticorpos com ativação da via clássica do complemento, importante no combate a forma promastigotas(356), poderia dificultar uma nova infecção. Portanto, fatores do parasito e do hospedeiro indicam que a disseminação precoce, em detrimento da disseminação tardia, é o passo fisiopatológico essencial no desenvolvimento da LM. Neste mesmo sentido, na análise univariada nós encontramos que o número de lesões e o número de segmentos corporais afetados foram associadas a disseminação precoce da *L. (V.) braziliensis* para a mucosa nasal. Estes fatores de risco para disseminação precoce são os mesmos fatores

encontrados para o desenvolvimento de lesão mucosa em outros estudos (79, 125) sugerindo uma possível relação preditiva entre a disseminação precoce e o desenvolvimento de LM. A confirmação desta relação, entretanto, requereria um estudo com seguimento dos pacientes por longo prazo, já que em muitos pacientes as lesões cutâneas precedem em muito tempo a lesão mucosa como já por nos explicado na introdução (132).

Outra possível limitação decorre do método utilizado para a detecção de *Leishmania* em nosso estudo. Poderíamos ter utilizado a cultura para avaliar a DP para mucosa nasal. A cultura seria uma forma de certificar que existem *Leishmanias* viáveis no local, entretanto, a sensibilidade de do método é baixa, mesmo com inoculação camundongos, 32% em um estudo(210). Ademais, é sugerido que formas amastigotas da *Leishmania* possam ficar em estado metabolicamente dormente no hospedeiro com a formação de uma subpopulação de parasitos que não se replicam(481, 482). Estes parasitos, portanto, mesmo que presentes na mucosa e com potencial de estimular o processo imune que leva a LM, poderiam não ser cultiváveis.

Metanálise mostrou que a sensibilidade da PCR para o diagnóstico da forma mucosa foi de 76% sendo, portanto, possível que pacientes com disseminação de *Leishmania* para a mucosa nasal não tenham sido incluídos no grupo DP. Além disso, os estudos que avaliam a acurácia diagnóstica incluem pacientes com lesão mucosa sendo que a acurácia diagnóstica pode ser diferente em nossa população. É mais provável, entretanto, que este teste molecular seja mais sensível na população estudada já que trata-se de pacientes no início do processo patológico em que a carga parasitária tende a ser maior(319). Na ausência de um desfecho substitutivo ideal, a pesquisa de *L. (V.) braziliensis* na mucosa nasal por reação em cadeia da polimerase foi escolhida por apresentar maior sensibilidade.

Outra questão a ser discutida é o método de coleta do material. *Swab* estudo realizado em nosso serviço mostrou que o PCR teve acurácia de 86% (73.81–93.05) para o diagnóstico de LM não se mostrando diferente do PCR de fragmento da lesão colhido por biópsia 88.37% (75.52–94.93)(148). O método de coleta portanto tem alta sensibilidade no nosso meio e tem a vantagem de ser não invasivo o que é adequado a um estudo observacional.

Uma possível limitação do PCR para avaliar disseminação para a mucosa nasal é que a simples presença do material genético da *Leishmania* não significa que existam parasitos viáveis e com potencial patogênico no local. Neste sentido a escolha dos alvos moleculares e por conseguinte dos primers e sondas utilizados na reação de amplificação são de importância para a interpretação dos resultados do teste(212, 483). Técnicas moleculares são mais comumente utilizadas para a detecção do parasito com objetivos diagnósticos(247), para identificação/genotipagem(311) e para avaliação da carga parasitária(484).

Utilizamos como alvo genético para a amplificação do DNA um fragmento de kDNA. Devido ao elevado número de cópias, são atingidos os maiores níveis de sensibilidade, sendo possível se detectar até um 0,0125 parasitos por ml de sangue(485). Em estudo que buscou comparar alvos moleculares HSP-70, ITS-1, kDNA e rRNA 18s, a reação de qPCR que utilizou kDNA apresentou melhor limite de detecção e Ct (do inglês ciclo limiar) muito menores que os demais alvos(214). Apesar de ser um alvo interessante para diagnóstico o kDNA pode apresentar limitações na identificação da espécie e quantificação, como já explicado na introdução geral. O primer utilizado em nosso estudo é capaz de amplificar sequencias de kDNA de outras espécies do subgênero *Viannia*(244), o que, apesar de não permitir a diferenciação, torna o método potencialmente mais sensível. Podemos concluir, portanto, que apesar de não permitir a diferenciação das espécies, o alvo utilizado para a avaliação do desfecho apresenta alta sensibilidade para a detecção de espécies do subgênero *Viannia*, as quais são as mais implicadas no desenvolvimento de LM em nosso meio.

Outra possível limitação do alvo molecular utilizado neste estudo está em sua correlação com a viabilidade do parasito. Apesar de tanto DNA como o RNA tem sido utilizados como indicadores de viabilidade em microorganismos(240), kDNA de *Leishmania* pode ser amplificado em sangue de doadores assintomáticos(213). Em teoria alvos de RNA são melhores para testes que procuram avaliar viabilidade já que são menos resistentes a temperatura(486) e tem menor meia vida(487), mas o DNA também é um indicador já que ocorre rápida degradação após tratamento (488, 489). Neste aspecto, o tamanho do amplicon também parece importante sendo amplicons maiores mais associados a viabilidade(490). Análise molecular da presença de ácidos nucleicos, apesar de ser um indicador, é falha como determinante de viabilidade de

microorganismos devendo ser interpretada com cautela(240). Desta forma levando em conta apenas a viabilidade do parasito, a utilização de alvo molecular de kDNA poderia ser menos específica que um alvo de RNA.

Devemos considerar, entretanto, o estágio do ciclo de vida do parasito quando da realização do teste já que a quantidade de ácidos nucleicos varia a depender da forma e atividade metabólica do parasito(491). Como já citado, a *Leishmania* poderia ficar em um estado dormente (481, 482) e isso é compatível com o achado clínico de que ela pode ser encontrada viável em cicatrizes de lesão cutânea(492) e de que pode ocorrer reativação da doença muito tempo após a exposição inicial(493, 494). Em outros microorganismos o estado de dormência geralmente vem associado a diminuições na quantidade de RNA, em 154 16s rRNA no caso do *Vibrio cholerae*(495). Na *Leishmania* a quantidade de RNA varia bastante entre os diferentes estágios do parasito sendo que estudo com *L. (V.) braziliensis* mostrou que a forma amastigota intracelular possui quantidade de 28S rRNA 403 vezes menor que a forma promastigota procíclica. O autor observou que esta diminuição veio acompanhada com fenótipo celular compatível com dormência. No mesmo estudo a diminuição da quantidade de kDNA entre as duas formas foi de apenas duas vezes sugerindo que os testes que usam RNA como alvo molecular são potencialmente menos sensíveis para detecção de *Leishmania spp* quando comparados aos que utilizam kDNA(491). Outro estudo também não mostrou variação significativa de kDNA do miniciclo entre as formas promastigota e amastigota(262).

A utilização de alvo de RNA poderia, portanto, limitar a sensibilidade do teste na hipótese de dormência do parasito já que em outros organismos existe grande diminuição da quantidade de RNA neste estado(495) e a quantidade de RNA varia de forma mais intensa que o kDNA entre os estágios evolutivos da *Leishmania*(311, 491). Desta forma, entendemos que a escolha do kDNA como alvo molecular foi a mais adequada por apresentar maior sensibilidade inclusive para formas potencialmente dormentes da *Leishmania*, envolvidas na patogênese da LM.

3.5.3 A dosagem de citocinas séricas

No modelo de estudo patogênese da Leishmaniose optamos por incluir a dosagem de citocinas séricas de pacientes com LC. Após o contato com o hospedeiro a resposta imune passa a ter um valor central no estudo da Leishmaniose e, portanto,

a compreensão dos métodos disponíveis para seu estudo passa a ter papel central na interpretação dos resultados do estudo. Entendermos que o processo de disseminação tenha participação de vários compartimentos corporais, a avaliação de marcadores imunológicos no soro, nos parece uma opção adequada aos objetivos do estudo. É importante entender, entretanto, que o método por nos utilizado apresenta diversas limitações que merecem ser mais bem discutidas.

Como explicado na introdução deste capítulo a avaliação das fontes celulares das citocinas estudadas poderia ser uma opção interessante permitindo avaliar com mais detalhes a resposta imune sistêmica. Esta avaliação, por outro lado, adicionaria complexidade ao estudo, especialmente porque muitas das citocinas estudadas têm fontes teciduais como hepatócitos, células endoteliais e fibroblastos. Este tipo de estudo utilizando protocolo de avaliação semelhante ao nosso seria, entretanto, importante para trabalhos futuros.

No mesmo sentido a realização de teste funcional em estudo com desenho semelhante ao nosso seria capaz de oferecer informações adicionais, como a produção de citocinas em resposta ao antígeno. Por outro lado, além de tais testes serem mais frequentemente utilizados na avaliação de citocinas efetoras da resposta imune adaptativa, o reestímulo com o antígeno de *Leishmania* adiciona dois fatores de complexidade ao estudo que seriam, 1- o antígeno utilizado no teste e 2- a incapacidade de mimetizar completamente as interações célula a célula que ocorrem no tecido. No mesmo sentido o estudo da disseminação da *Leishmania* por modelos animais, apesar de interessante, seria de complexidade elevada e seus resultados não seriam automaticamente traduzidos para o ser humano.

Outra consideração a ser feita é o método de dosagem das citocinas. Como explicado na introdução do capítulo existe uma grande variedade de métodos e a forma de dosagem deve ser considerada na para a interpretação dos resultados. Desta forma, apesar de existirem referências para estes valores na literatura como mostrado no quadro 6, entendemos que os níveis de citocinas por nos observados são melhores interpretados comparando os grupos do estudo, tendo pouco valor a comparação com outros estudos. É importante também considerar os níveis de detecção do método utilizado, sendo que as duas variáveis que permaneceram no modelo final (IL-6 e IL-12) tiveram todos os seus valores acima dos limites de detecção teóricos descritos no manual do kit utilizado(496).

3.5.4 Disseminação da *Leishmania* para a mucosa nasal

Neste estudo observamos que 30,3% dos pacientes com lesão cutânea apresentavam disseminação precoce de *L. (V.) braziliensis* para mucosa nasal. Em outro estudo realizado na Bahia Canário e colaboradores mostraram que 7,8% dos pacientes com LC apresentavam evidência de *Leishmania sp* em mucosa nasal(223). As diferenças de prevalência podem ser tanto devido a diferenças metodológicas do estudo como relacionadas a diferenças na população estudada. Além de utilizar primers diferentes daqueles que usamos, a etapa de análise foi realizada através de eletroforese em gel seguida de coloração com brometo de etídio e visualização em luz UV de acordo com o protocolo proposto por Oliveira e cols(497). Nós realizamos PCR pela metodologia em tempo real que segundo alguns autores pode melhorar a sensibilidade da reação(153, 498). Além disso os critérios de inclusão dos estudos foram diferentes sendo que nosso objetivo foi avaliar a disseminação precoce de *L. (V.) braziliensis* para a mucosa nasal e não a positividade do PCR nasal para *Leishmania spp* em mucosa íntegra. Desta forma Canario e cols excluíram pacientes que após investigação apresentavam lesões em mucosa nasal o que possivelmente reduziu o número de pacientes com positividade para *L. (V.) braziliensis* em mucosa nasal. Por outro lado, nós não excluimos pacientes com lesão clínica já que a presença das mesmas não fala contra a disseminação precoce.

Ademais, é importante considerar fatores epidemiológicos associados, sendo que estudo de Bedoya-Pacheco sugeriu que a proporção de lesão mucosa está inversamente associada com prevalência de LTA na região(118). Como a região centro oeste tem menor prevalência de LTA que a nordeste(499), é possível que a maior taxa de disseminação precoce que tivemos seja associada a este fator epidemiológico de forma análoga.

Outro fator importante pode ser a temperatura. Neste sentido, as espécies que causam Leishmaniose cutânea tem a multiplicação diminuída à temperaturas de 34 °C ou mais(343) sendo que o crescimento preferencial destas espécies na pele e mucosa tem sido relacionado à sensibilidade térmica(500). A mucosa nasal tem importante papel na umidificação e aquecimento do ar sendo que a temperatura próxima ao septo anterior, local de maior ocorrência de Leishmaniose mucosa, é

mais baixa que no restante da cavidade nasal(344). A temperatura do ar nesta região está intrinsecamente ligada a temperatura do ar ambiental(344). A temperatura média do ar ao longo do ano é maior em Salvador(24,7 °C) que em Brasília(20,8 °C)(501) o que pode ser uma das bases fisiopatogênicas para a maior disseminação de *L. (V.) brasiliensis* para a mucosa nasal em nossa região(501). Em trabalho realizado em nosso serviço em 2005 observamos que 40,8% dos pacientes com LTA apresentavam a forma mucosa(124) o que sugere uma alta proporção de LM em nossa região. Este dado deve, entretanto, ser interpretado com cautela, já que, por ser um centro de referência pacientes com lesão mucosa poderiam ser mais frequentemente referenciados que aqueles com a forma apenas cutânea. De acordo com Bedoya-pacheco a proporção de LM em maiores de 40 anos de idade foi de 5.8% no nordeste, enquanto no centro oeste esta foi de 13.2%(118). A proporção de LM em locais de clima frio tende a ser bastante variável, entre 0.3 e 16.5%(115, 116, 119, 120, 122). É importante considerar que além do clima existem diferenças entre as características básicas das populações estudadas e das espécies e cepas de *Leishmanias* destes locais o que pode explicar as diferentes taxas de acometimento mucoso encontradas.

A proporção de pacientes com disseminação precoce para a mucosa nasal é diferente da encontrada em series de casos colombianas. Em estudo que incluiu 24 pacientes com lesão cutânea ativa, dos quais dois também tinham lesão mucosa, Figueiroa e colaboradores demonstraram que 58% dos pacientes tinham DNA de *Leishmania sp* em mucosa nasal. A positividade da mucosa nasal foi maior que de swab coletado de região de tonsilas e que de conjuntiva ocular(502). A diferença encontrada entre o estudo deles e o nosso pode estar relacionada a variações metodológicas relacionadas ao tamanho da amostra, aos métodos utilizados para a pesquisa dos parasitos e relacionadas a espécie de *Leishmania sp* mais frequentemente encontradas-na região. Quanto menor o tamanho amostral maior o intervalo de confiança em torno da estimativa pontual(503). Adicionalmente, estudos sugerem que a espécie mais encontrada na região é a *L. (V.) panamensis* (215) que geralmente causa lesão mucosa simultaneamente à lesão cutânea(31) o que sugere maior taxa de disseminação precoce. Outro estudo colombiano também mostrou maior taxa de disseminação precoce que a por nós observada(215).

3.6 CONCLUSÕES

1. A disseminação precoce de *L. (V.) braziliensis* parece estar associada ao número de segmentos corporais acometidos e aos níveis séricos de citocinas IL-12 e IL-6, pela análise multivariada.
2. A disseminação precoce ocorreu em 30,3% dos pacientes com Leishmaniose cutânea na população estudada.
3. Na análise univariada, além dos segmentos corporais acometidos o número de lesões também foi associado a maior prevalência de disseminação precoce.

CAPÍTULO 4 – MORFOLOGIA DA LESÃO COMO POSSÍVEL PREDITOR CLÍNICO
DA DISSEMINAÇÃO DA LEISHMANIA PARA A MUCOSA NASAL: UM ESTUDO
TRANSVERSAL

4.1 INTRODUÇÃO

A morfologia da lesão clínica é um dos aspectos definidores da forma clínica de LTA. Enquanto a LC é caracterizada por úlcera com bordas bem delimitadas (26) e a LD por lesões papulares ou acneiformes em múltiplas partes do corpo(78, 79) a LCD é caracterizada por placas e nódulos infiltrados de crescimento lento (88, 95-97). No mesmo sentido, formas não ulceradas como a LCD tem maior carga parasitária, menor presença de necrose e menor infiltrado linfocitário (311, 312). Já a LC caracteristicamente apresenta infiltrado inflamatório intenso frequentemente associado à necrose e podendo conter células epitelióides e células gigantes do tipo Langerhans (255). A forma clínica da doença é sabidamente associada à frequência e característica do acometimento mucoso. A LD por exemplo vem associada ao acometimento mucoso em 28-38% dos casos (78, 83), sendo que na LC este ocorre em 3 a 5% dos casos(112). Já a forma difusa pode levar a acometimento mucoso em um terço e metade dos pacientes a depender do estudo (98-100), entretanto este acometimento é assumido como superficial (99). Neste sentido a análise da morfologia da lesão de forma sistemática é potencialmente capaz de indicar novos preditores morfológicos para o acometimento mucoso na Leishmaniose. Buscando entender melhor os fatores morfológicos associados com a disseminação da *L. (V.) Brasiliensis* para a mucosa nasal avaliamos de forma sistemática a morfologia da lesão de pacientes com LTA através de fotografias padronizadas.

4.2 OBJETIVO

Buscar, através de um modelo multivariado, variáveis morfológicas de lesões cutâneas que possam estar associadas à disseminação precoce da *L. (V.) braziliensis* para a mucosa nasal.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Características do estudo

Trata-se de um estudo transversal onde todos os pacientes com suspeita de Leishmaniose cutânea, atendidos no período de fevereiro de 2017 a dezembro de

2020, foram submetidos a exame para detecção da presença de DNA de *L. (V.) braziliensis* através da reação em cadeia da polimerase. Todos concordaram em participar voluntariamente da pesquisa, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os pacientes que não tiveram o diagnóstico de LTA confirmado foram excluídos do estudo. Foram também colhidos os dados clínicos dos pacientes com Leishmaniose em ficha preparada com esta finalidade. Os pacientes foram também submetidos à fotografia padronizada para posterior análise.

4.3.2 Local do estudo

O recrutamento dos pacientes foi realizado no Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal. As fotografias foram tiradas durante a primeira consulta dos pacientes no serviço através de metodologia sistematizada. O HUB-UnB é um serviço de referência, onde os pacientes são encaminhados de unidades básicas de saúde para confirmação diagnóstica, após suspeita clínica de LTA. O exame de imunofluorescência indireta foi realizado no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal-LACEN-DF. Os exames de esfregaço, cultura e PCR das lesões foram realizados no Laboratório de Dermatologicologia, da Universidade de Brasília.

4.3.3 População estudada, definição de caso e cálculo amostral

Foram incluídos no estudo consecutivamente pacientes de qualquer idade com lesões cutâneas ativas sugestivas de Leishmaniose, sendo então coletados dados clínicos e laboratoriais. Após investigação inicial, pacientes em terapia imunossupressora ou sem diagnóstico confirmado de LC foram excluídos, sendo incluídos apenas pacientes com lesões cutâneas confirmadas como LTA. Casos de disseminação precoce de LTA (DP) foram definidos como pacientes com CL ativa com presença, ou seja, positividade de DNA de *L. (V.) braziliensis* na mucosa nasal. Pacientes com teste negativo foram processados como controles (CT).

Os pacientes foram divididos em dois grupos: 1 - Pacientes com a presença de DNA de *L. (V.) braziliensis* em mucosa nasal- Disseminação precoce (DP); 2 – Pacientes sem a presença de DNA de *L. (V.) braziliensis* na mucosa nasal- Controles (CT).

A definição de caso de LTA baseou se em critérios epidemiológicos, clínicos, laboratoriais parasitológicos e imunológicos, descritos em Gomes et al 2014 e de resposta com cura ao tratamento específico(13). Pacientes com clínica e epidemiologia compatível foram considerados como tendo o diagnóstico se apresentassem: 1- Dois dos seguintes exames: a- Imunofluorescência indireta positiva para LTA, b- Intradermoreação de Montenegro positiva, c- Padrão histopatológico de LTA de acordo com a definição de Magalhães(330) OU 2- Um dos seguintes: a- Presença do parasito ao exame histopatológico, b- Achado do parasito por reação em cadeia da Polimerase, c- cultura positiva e d- esfregaço positivo OU 3- melhora de lesões após tratamento para LTA. Foram excluídos pacientes em que não foi concluído o diagnóstico de Leishmaniose ou que tiveram outro diagnóstico confirmado após investigação(Figura 35).

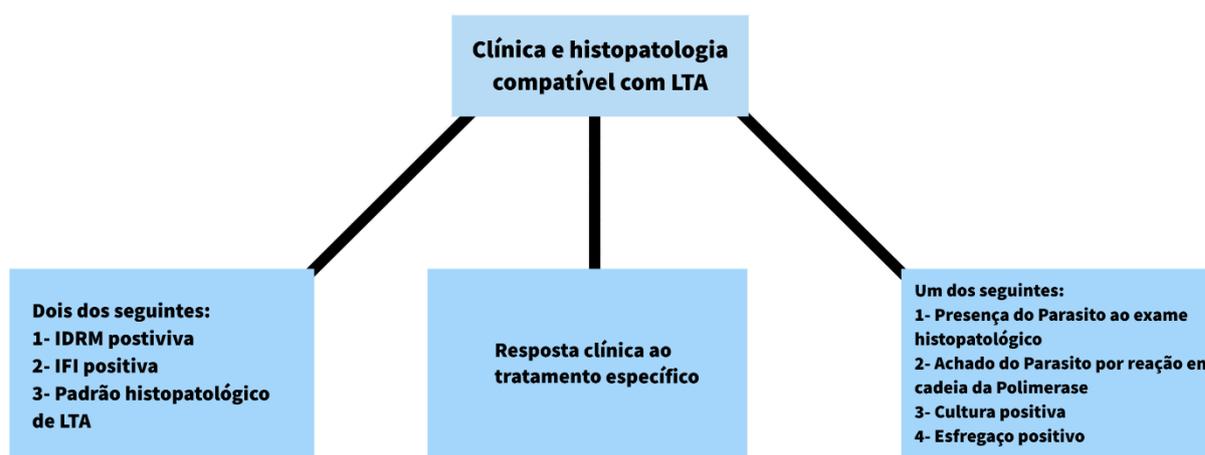


Figura 35- Fluxograma para o diagnóstico de LTA

4.3.4 Exames diagnósticos para confirmação de LTA

Na consulta com a dermatologia foi realizada se inspeção das cavidades oral e nasal com auxílio da rinoscopia anterior e os pacientes foram encaminhados para avaliação pela otorrinolaringologia que realizou avaliação por nasofibrosopia, videolaringoscopia e videotoscopia. Para o diagnóstico foram colhidos os seguintes exames:

Imunológicos: Intradermoreação de Montenegro e Imunofluorescência indireta

Parasitológico: cultura de aspirado da lesão em meio Neal, Novy, Nicolle (NNN); esfregaço por Imprint em lâmina de microscopia corada pelo Giemsa.

Exame histopatológico (HP) com as colorações Hematoxilina e Eosina; Giemsa; Ziehl-Neelsen; coloração pela prata.

Moleculares: PCR em fragmento de lesão de biópsia da lesão cutânea e de *swab* nasal para a pesquisa de Leishmania.

4.3.5 Coleta de dados clínicos e laboratoriais

Os dados aqui descritos referentes à população estudada e os exames realizados foram idênticos aos utilizados no estudo do capítulo 3(pg 115), exceto a análise da morfologia da lesão é que especifica deste capítulo.

Os dados clínicos e laboratoriais foram coletados com uso de instrumento específico. Após a realização de exame endoscópico otorrinolaringológico os pacientes com lesões mucosas tiveram suas lesões estagiadas de acordo com classificação de Lessa(137). A disseminação do parasito para a mucosa foi avaliada por meio de coleta de material por *swab* nasal. O *swab* foi girado cinco vezes em cada fossa nasal no septo anterior e cabeça da concha inferior. A extração de DNA das amostras de *swabs* nasais foi realizada com o kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Reação em cadeia da polimerase qualitativa em tempo real (PCR) com TaqMan reagentes específicos de *L. (V.) braziliensis* foram usados, a saber, os iniciadores 5' = - TGCTATAAAATCGTACCACCCGACA-3' = e 5' = - GAACGGGGTTTCTGTATGCCATTT-3' =, e a sonda FAM-TTGCAGACCCGGCAGACCC FAM, 6-carboxifluoresceína; TAMRA, 6-carboxitetrametilrodamina), resultando em um produto amplificado de 83 pb(240). A pesquisa de *L. (V.) braziliensis* no *swab* nasal foi o último procedimento a ser realizado, após todos os procedimentos diagnósticos e a coleta dos dados clínicos e fotografia sistemática da lesão.

Análise da morfologia da lesão: foi realizada através de fotografia sistemática da lesão por Câmera fotográfica Sony Full frame A7RII (*Sony Group Corporation*, Minato, Toquio-JP) Lente Sony FE 24-105mm F4 G OSS com a utilização de *flash*. As imagens foram analisadas por meio do *software* Image J (Madison, WI, USA), na escala ORC Forensics Scale PT- 041 (Oregon City, OR, USA). Um exemplo de fotografia está na figura 36 sendo a medida realizada utilizando o comando “set scale”(Figura 37) do programa e a área de interesse delimitada medida através do comando “*measure*” (Figura 38). Foram extraídos os seguintes dados de cada lesão:

- Área total da lesão: incluindo as três áreas descritas a seguir:

- Área de úlcera: definida como área sem cobertura epidérmica;
- Área de infiltração: definida como área elevada da lesão;
- Área sem infiltração: Definida como área não elevada mais com alteração de aparência (cor e aspecto da superfície).



Figura 36- Imagem de lesão com escala

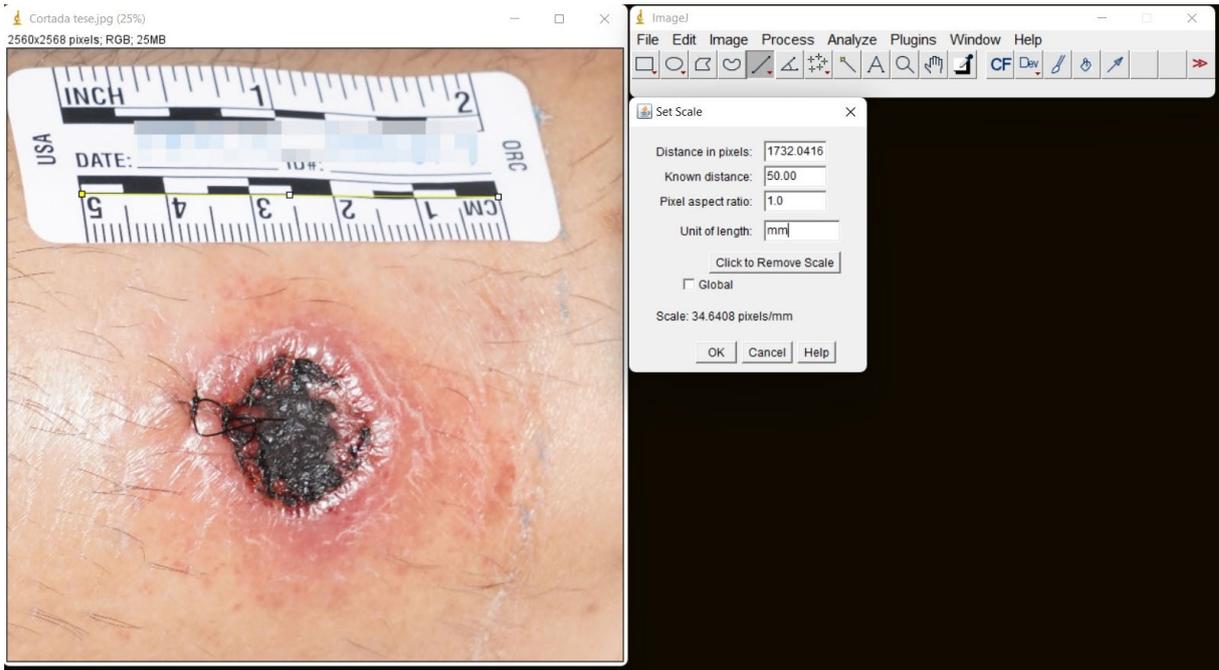


Figura 37- Com a utilização da escala como referência para as medidas



Figura 38- A área de interesse é demarcada(círculo amarelo) sendo sua área medida através do programa- no caso foi medida a área de úlcera.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA E RESULTADOS

A amostra foi de conveniência sendo rastreados para inclusão os novos pacientes que procuraram o serviço de dermatologia do HUB no período do estudo. A figura 39 mostra o número de pacientes incluídos. As variáveis quantitativas foram avaliadas com relação a assimetria e curtose e foi realizado teste de normalidade de Doornik-

Hansen. As variáveis com distribuição normal foram apresentadas com média \pm desvio padrão e as não normais como mediana e amplitude interquartil (Tabelas 9 e 10). As variáveis com distribuição normal foram analisadas teste t de Student e as não normais com teste da soma dos postos de Wilcoxon (Tabela 11). As variáveis qualitativas foram analisadas com o teste exato de Fisher (Tabela 12).

As variáveis com valor de $P < 0,25$ na análise univariada foram selecionadas para análise multivariada. Foram selecionadas as variáveis tempo de evolução, área de infiltração, número de segmentos corporais acometidos e presença de lesão em membro superior. Devido à presença de outliers extremos, as variáveis tempo e evolução de lesões e área de infiltração foram winsorizadas a 90%. Foi realizada imputação por regressão de dois valores do tempo de evolução em meses utilizando como base a variável dependente e as covariáveis importantes.

Análise multivariada foi realizada com o teste de Poisson com variância robusta visando determinar os preditores significativos para positividade de PCR nasal de Leishmaniose na amostra. Variáveis selecionadas foram incluídas no modelo multivariado. Foi feita análise para multicolinearidade através do “*Variance inflation factor*”. Procedeu-se posteriormente, ajustes dessas variáveis através de seleção retrograda. Neste modelo as variáveis foram inicialmente inseridas no modelo e sequencialmente retiradas sendo os modelos comparados pelo critério de informação Bayesiano. Permaneceram no modelo final apenas aquelas variáveis com $p < 0,05$. No final foram calculadas as razões de prevalência e seus respectivos intervalos de 95 % de confiança. Após análise foi realizada estudo de “*Goodness of Fit*” de Pearson, que não se mostrou significativo. Permaneceu no modelo final apenas aquela variável com $p < 0,05$, sendo essa a presença de lesão em membros superiores. A partir dessa variável, calculou-se a razão de prevalência e seus respectivos intervalos de 95 % de confiança. O valor encontrado foi de 1.18 (IC 95% 1.01 – 1.38), com $p = 0.036$.

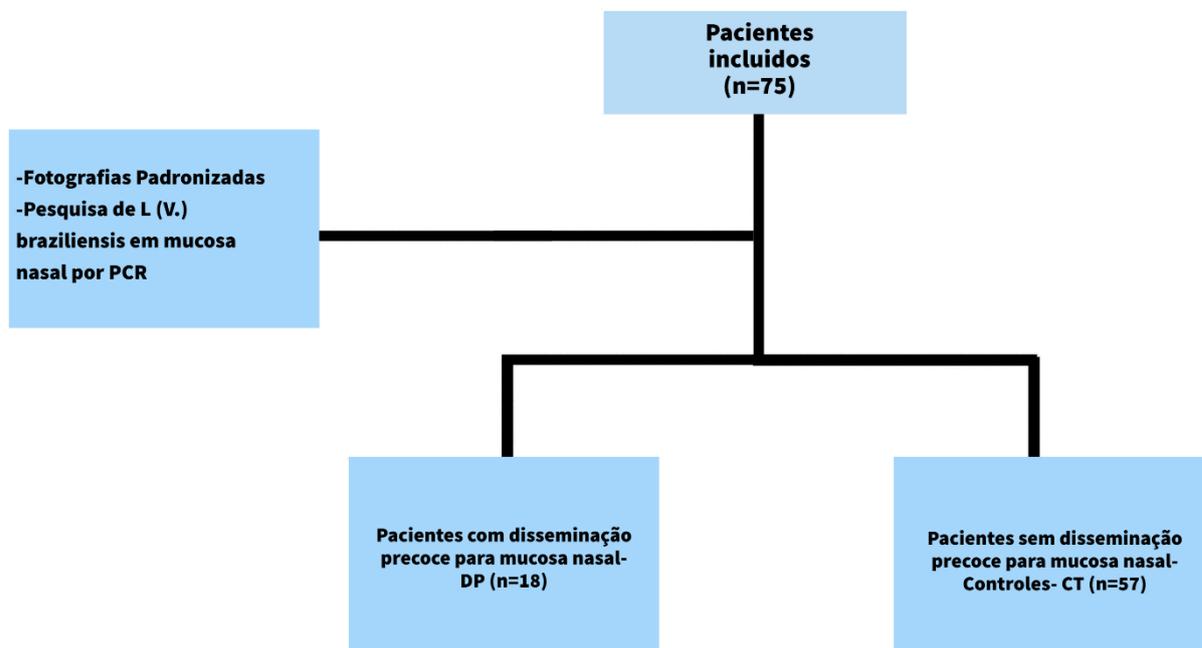


Figura 39- Fluxograma do estudo

Tabela 9- Características da população- variáveis quantitativas
Variável

Idade- anos (média e DP)	41.36 (17.87)
Tempo de evolução das lesões- meses (mediana e AIQ)	3(3)
Número de lesões (mediana e AIQ)	1(1)
Soma das áreas das lesões (mm ²)	983.38 (1857.47)
Área de Mácula (mediana e AIQ)	474.52 (701.09)
Área de infiltração (mediana e AIQ)	259.66 (429.81)
Área de úlcera (mediana e AIQ)	264.41 (459.85)
Número de segmentos corporais acometidos (mediana e AIQ)	1(0)

*DP- Desvio padrão, AIQ- Intervalo interquartil

Tabela 10- Características da população- variáveis categóricas

Variável	N (%)
Sexo	
Masculino	44 (58.67)
Feminino	31 (41.33)
Swab Nasal positivo	18 (24)
Presença de sintomas mucosos	13 (17.33)
Presença de Lesões em membros inferiores e quadril	42 (56)
Presença de lesões em membros superiores	30 (40)
Presença de lesões em tronco	8 (10.67)

Presença de lesões em face e região cervical 11 (14.67)

Tabela 11 - Características da população- variáveis quantitativas, por subgrupo com medidas de associação na análise univariada

Variável	Swab nasal Positivo	Swab nasal negativo	P Valor
Idade (anos)	43.05(17.92)	44.68421 (16.36)	0.72*
Tempo de evolução das Lesões- meses (mediana e AIQ)	2.5 (2.5)	3(3)	0.14†
Número de Lesões (mediana e AIQ)	1(2)	1(1)	0.31†
Soma das áreas das lesões (mm ²)	1325.02(2162.53)	923.03 (1559.58)	0.42†
Área de Mácula	546.12 (1136.94)	433.71 (673.67)	0.37†
Área de infiltração	333.99(391.27)	213.32 (374.2)	0.19†
Área de úlcera	348.53(443.75)	233.4 (576.56)	0.76†
Número de segmentos corporais acometidos	1(1)	1(0)	0.17†

*teste t de *Student*, †teste da soma dos postos de Wilcoxon

Tabela 12- Características da população variáveis categóricas por subgrupo- por subgrupo com medidas de associação na análise univariada

Variável	Swab Pos- N (%)	Swab Neg- N (%)	P Valor†
Sexo			
Masculino	11 (61.11)	33 (57.89)	1.0
Feminino	7 (38.89)	24 (42.11)	
Número de seguimentos do corpo acometido			
Presença de sintomas mucosos	4 (22.22)	9 (15.79)	
Presença de lesões em membros inferiores e quadril	9 (50.00)	33 (57.89)	0.59
Presença de lesões em membros superiores	11 (61.11)	19 (33.33)	0.05
Presença de lesões em tronco	1 (5.56)	7 (12.28)	1.0
Presença de lesões em face e região cervical	3 (16.67)	8 (14.04)	0.71

†teste exato de Fisher

4.5 DISCUSSÃO

A literatura mostra grande variação na proporção de pacientes com LC que apresentam DNA de *Leishmania* na mucosa nasal representada por 7,8% (219) a 58% (310). Desta forma não consideramos que a proporção de 24% encontrada neste estudo seja muito diferente da encontrada no estudo do capítulo 3 desta tese, que foi de 30,3%. Considerando que por motivos operacionais foram incluídos mais pacientes no estudo descrito no capítulo 4, optamos por discutir este assunto mais neste. Considerações metodológicas relativas à disseminação da *Leishmania* e a

utilização de desfecho substituto também serão feitas no capítulo 3. Nos limitaremos aqui, portanto, a discutir questões específicas a este capítulo relacionadas a morfologia da lesão.

A formação de úlcera na Leishmaniose é um processo dependente do tempo sendo que durante os 30 primeiros dias a LC é caracterizada por lesão geralmente não ulcerada(504) existindo correlação também entre o tempo de doença e o tamanho da lesão(505). Também existe interação entre os fatores imunológicos possivelmente associados à progressão para a mucosa e o tamanho da lesão; incluindo produção antígeno específica de TNF- α e IFN- γ por PBMC(505, 506) e quantidade de macrófagos em lesões precoces de LC(507). Além disso, a forma mucosa também já foi associada ao número de lesões cutâneas(125), lesões acima da cintura(125) ausência de tratamento ou tratamento inadequado(32), presença de infecção pelo HIV(127-129), idade maior que 22 anos, sexo masculino e duração da doença maior que 4 meses(123). Desta forma, devido às possíveis múltiplas associações entre disseminação da *Leishmania* e fatores clínicos, procuramos no estudo isolar o efeito dos aspectos morfológicos da lesão através dos critérios de inclusão e de análise multivariada. Não foram incluídos no estudo pacientes com *raziliensis* pela análise multivariada- ver discussão capítulo 3. As covariáveis idade, sexo, número e localização da lesão foram considerados no modelo multivariado.

Foi encontrada associação entre a presença de lesões em membros superiores e a disseminação de *L. (V.) braziliensis* para a mucosa nasal no modelo final. Esta associação, entretanto, tem que ser vista com cautela já que neste modelo permaneceu apenas uma variável e que na análise univariada utilizando o teste exato de Fisher a associação não foi significativa($p=0.053$). A divergência nos resultados pode ser, portanto, explicada pelos modelos estatísticos utilizados para análise. A associação encontrada no modelo final, entretanto, tem sentido fisiopatológico já que a disseminação da *Leishmania* é linfohematogênica(508-510) e a o caminho linfático ou vascular a ser percorrido pelo parasito até a chegada a mucosa nasal é menor quando comparado a lesão típica em membro inferior.

Apesar de não termos encontrado outras associações significativas das áreas estudadas com a disseminação de *Leishmania* para a mucosa nasal, os pacientes com presença de DNA de *Leishmania* na mucosa nasal, como esperado, tiveram lesões maiores com maior área de mácula, infiltração e úlcera. É possível que a não

significância da associação seja decorrente da falta de poder estatístico do estudo. Como o tamanho da amostra foi determinado por conveniência isso não era inesperado. Os dados servirão, entretanto, como base para o cálculo de uma amostra mais adequada para estudo posterior.

4.6 CONCLUSÃO

Os pacientes com disseminação precoce de leishmania para a mucosa nasal tiveram maiores áreas total, de úlcera, de macula e de infiltração o que os controles, mas esta associação não foi significativa em modelo multivariado.

5. REFERÊNCIAS

1. Poinar Jr G, Poinar R. Fossil evidence of insect pathogens. *Journal of invertebrate pathology*. 2005;89(3):243-50.
2. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasites & vectors*. 2017;10(1):82.
3. 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.
4. Momen H, Cupolillo E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000;95(4):583-8.
5. Zink AR, Spigelman M, Schraut B, Greenblatt CL, Nerlich AG, Donoghue HD. Leishmaniasis in ancient Egypt and upper Nubia. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(10):1616.
6. Enciso AJA, Moreira JS, Marzochi MC. Lesión lítica craneana por Leishmaniasis en Makat-tampu durante el império inca: siglos XV-XVI, valle dei Bajo Rímac, Peru. *Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia*. 2001(11):227-42.
7. Wright JH. Protozoa in a case of tropical ulcer ("Delhi sore"). *The Journal of medical research*. 1903;10(3):472.
8. 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.
9. Rabello E. Contribuição ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil. *Origens, histórico e sinonímia Annaes Brasileiros de Dermatologia e Syphilographia*. 1925;1:3-31.
10. Novo SP, Leles D, Bianucci R, Araujo A. *Leishmania tarentolae* molecular signatures in a 300 hundred-years-old human Brazilian mummy. *Parasites & vectors*. 2015;8(1):1-8.
11. Montenegro J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Archives of Dermatology and Syphilology*. 1926;13(2):187-94.
12. Pinheiro ABS, Kurizky PS, Ferreira MdF, Mota MAdS, Ribeiro JS, Oliveira Filho EZd, et al. The accuracy of the Montenegro skin test for leishmaniasis in PCR-negative patients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2020;53.
13. 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.
14. 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.
15. World Health organization. Leishmaniasis World Health organization Webpage newsroom: World Health organization; 2021 [updated 5/20/2021. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
16. Organization WH. Leishmaniasis 2018 [Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en>.
17. 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.
18. Bailey F, Mondragon-Shem K, Haines LR, Olabi A, Alorfi A, Ruiz-Postigo JA, et al. Cutaneous leishmaniasis and co-morbid major depressive disorder: A systematic review with burden estimates. *PLoS neglected tropical diseases*. 2019;13(2):e0007092.
19. Simsek Z, Ak D, Altindag A, Günes M. Prevalence and predictors of mental disorders among women in Sanliurfa, Southeastern Turkey. *Journal of Public Health*. 2008;30(4):487-93.
20. 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.
21. Luz G, Milan P, Galvão C. New World Mucocutaneous Leishmaniasis with Oral Manifestations: Case Report and Damage Repair. 2014.
22. 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.
23. 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.

24. Costa JML, Vale KC, Cecílio IN, Osaki NK, Netto EM, Tada MS, et al. Aspectos psicossociais e estigmatizantes da leishmaniose cutâneo-mucosa. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1987;20(2):77-82.
25. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *The Lancet*. 2018;392(10151):951-70.
26. Ministério da Saúde SdVeS, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana atualizada. Editora MS; 2017.
27. 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.
28. Santos G, Kückelhaus S, Roselino A, Chaer W, Sampaio R. Leishmania (Viannia) braziliensis is the main species causing cutaneous leishmaniasis in the Federal District of Brazil. *Journal of Venous Diseases and Disorders*. 2012;18(3):340-3.
29. Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77(2):266-74.
30. 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.
31. Osorio LE, Castillo CM, Ochoa MT. Mucosal leishmaniasis due to Leishmania (Viannia) panamensis in Colombia: clinical characteristics. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1998;59(1):49-52.
32. de Oliveira Guerra JA, Prestes SR, Silveira H, Câmara LidAR, Gama P, Moura A, et al. Mucosal leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Viannia) guyanensis in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):e980.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Luz E, Membrive N, Castro E, Dereure J, Pratloug 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.
38. 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.
39. Silveira TGV, Teodoro U, Lonardon 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.

44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. Lucciola GV, Passos VdA, Patrus A. Mudança no padrão epidemiológico da leishmaniose tegumentar americana. *An Bras Dermatol*. 1996;71:99-105.
49. Sampaio RNR, Gonçalves MdC, Leite VA, França BV, Santos GMd, Carvalho MdSL, et al. Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. 2009.
50. 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.
51. World Health Organization, editor *Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis*. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis; 2010: World Health Organization.
52. Schriefer A, Guimarães LH, Machado PR, Lessa M, Lessa HA, Lago E, et al. Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. *Emerging infectious diseases*. 2009;15(6):871.
53. Jeronimo SM, Duggal P, Braz RF, Cheng C, Monteiro GR, Nascimento ET, et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2004;36(6-7):443-9.
54. PAHO. *Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas, dezembro 2020: Pan American Health Organization 2020* [Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>].
55. 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.
56. Barreto MB, Carneiro AL, Torres FAG, Sampaio RNR. *Lutzomyia whitmani* is the main vector of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Federal District and the most prevalent species in residential areas of the Administrative Region of Sobradinho. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2014;89(2):372-4.
57. Herrera G, Barragán N, Luna N, Martínez D, De Martino F, Medina J, et al. An interactive database of *Leishmania* species distribution in the Americas. *Scientific data*. 2020;7(1):1-7.
58. Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert review of anti-infective therapy*. 2010;8(4):419-33.
59. 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.
60. World Health Organization ECotcol. *Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis*. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis: World Health Organization; 2010.
61. Puig L, Pradinaud R. *Leishmania* and HIV co-infection: dermatological manifestations. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003;97 Suppl 1:107-14.
62. Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *The Lancet infectious diseases*. 2008;8(3):191-9.
63. Barroso DH, Silva CE, Perdigão 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.
64. 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.
65. Singh S, Sharma U, Mishra J. Post-kala-azar dermal leishmaniasis: recent developments. *International journal of dermatology*. 2011;50(9):1099-108.
66. Morris-Jones S, Weber M. Medical mystery: painless ulcers—the answer. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(22):2313-4.

67. González U, Pinart M, Rengifo-Pardo M, Macaya A, Alvar J, Tweed J. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. The Cochrane Collaboration; 2009.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. Romero G, Guerra M, Paes MG, Macedo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L.(V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001;65(5):456-65.
72. 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.
73. 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.
74. Luz ZMP, Silva ARd, Silva FdO, Caligorne 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.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. Rosa MEA, Machado PRL. Disseminated Leishmaniasis: Clinical, immunological, and therapeutic aspects. *Drug Development Research*. 2011;72(6):437-41.
81. Dantas ML, Oliveira JM, Carvalho L, Passos ST, Queiroz A, Guimaraes LH, et al. Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(2):202-9.
82. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*. 1994;56(4):315-25.
83. Costa J, Marsden P, Llanos-Cuentas E, Netto E, Carvalho E, Barral A, et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *The Journal of tropical medicine and hygiene*. 1986;89(6):319-23.
84. 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.
85. 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.
86. 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.
87. 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.

88. 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.
89. Silva D. Leishmaniose anérgica hansenóide. *An Bras Dermatol*. 1982;57(3):147-50.
90. Shaw J, Pralong 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.
91. 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.
92. 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.
93. Convit J, Kerdel-Vegas F, Gordon B. Disseminated anergic cutaneous leishmaniasis. *British Journal of Dermatology*. 1962;74(4):132-5.
94. Convit J, Lapenta P. Sobre un caso de leishmaniasis tegumentaria de forma diseminada. *Revista de la Policlínica, Caracas*. 1948;17:153-8.
95. Barrientos LP. Um caso atípico de leishmaniose cutâneo-mucosa (espundia). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1948;46(2):415-8.
96. 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.
97. Costa J. Modalidades clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana. Barral A, Costa JML. *Leishmanias ea Leishmaniose tegumentar nas Americas Salvador: CYTED, CNPq2011*.
98. 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.
99. 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.
100. 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.
101. 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.
102. Menezes JA, Reis V, Thonon S. Perfuração do septo nasal em leishmaniose "cúti difusa". *An Bras Derm*. 1978;53:199-200.
103. 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.
104. Guimarães LH, Queiroz A, Silva JA, Silva SC, Magalhães V, Lago EL, et al. Atypical manifestations of cutaneous leishmaniasis in a region endemic for *Leishmania braziliensis*: clinical, immunological and parasitological aspects. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(12):e0005100.
105. Meireles CB, Maia LC, Soares GC, Teodoro IPP, Gadelha MdSV, da Silva CGL, et al. Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *Acta Tropica*. 2017;172:240-54.
106. Chichester AVA, dos Reis ALM, Castanheira ATL, da Silva Nascimento CV, Biasi BH, Lodi VJC, et al. American Cutaneous Leishmaniasis: A Pleomorphic Disease with Unusual Clinical Presentations-Report of Three Cases. *International Archives of Medicine*. 2020;13.
107. Gurel MS, Tekin B, Uzun S. Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. *Clinics in dermatology*. 2020;38(2):140-51.
108. 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.
109. Dassoni F, Abebe Z, Naafs B, Morrone A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis resembling borderline-tubercloid leprosy: a new clinical presentation? *Acta Derm Venereol*. 2013;93(1):74-7.
110. Roustan G, Jimenez J, Gutierrez-Solar B, Gallego J, Alvar J, Patron M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis with mucosal involvement in a kidney transplant recipient: treatment with liposomal amphotericin B. *The British journal of dermatology*. 1998;138(3):526-8.
111. Salam MA, Siddiqui MA, Nabi SG, Bhaskar KR, Mondal D. Post-kala-azar Dermal Leishmaniasis with Mucosal Involvement: An Unusual Case Presentation including Successful Treatment with Miltefosine. *J HEALTH POPUL NUTR*. 2013;31(2):294-7.

112. Abadías-Granado I, Diago A, Cerro PA, Palma-Ruiz AM, Gilaberte Y. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*. 2021.
113. Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado PRL, et al. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. 2007.
114. Rathi SK, Pandhi R, Khanna N, Chopra P. Mucosal and peri-orificial involvement in post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*. 2004;70(5):280.
115. 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.
116. 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.
117. 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.
118. 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.
119. 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.
120. Faucher B, Pomares C, Fourcade S, Benyamine A, Marty P, Pratlong L, et al. Mucosal *Leishmania infantum* leishmaniasis: specific pattern in a multicentre survey and historical cases. *Journal of Infection*. 2011;63(1):76-82.
121. Herwaldt MBL. Leishmaniasis. *The Lancet*. 1999;354(9185):1191-9.
122. 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.
123. 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.
124. 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.
125. Cuentas EL, Marsden P, Cuba C, Barreto A, Campos M. Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. *The Lancet*. 1984;324(8397):295.
126. Barroso DH, Nóbrega OdT, de Araújo CN, Freire GSM, Martins SS, Rodrigues BC, et al. The Presence of *Leishmania braziliensis* DNA in the Nasal Mucosa of Cutaneous Leishmaniasis Patients and the Search for Possible Clinical and Immunological Patterns of Disease Progression: A Cross Sectional Study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;11(1005).
127. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet J-P, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(2):334-59.
128. Guerra JAO, Coelho LI, Pereira FR, Siqueira AM, Ribeiro RL, Almeida TML, et al. American tegumentary leishmaniasis and HIV-AIDS association in a tertiary care center in the Brazilian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;85(3):524-7.
129. Rabello A, Orsini M, Disch J. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 2003;97(sup1):17-28.
130. Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 2003;97(sup1):3-15.
131. Lindoso JA, Barbosa R, Posada-Vergara M, Duarte M, Oyafuso L, Amato V, et al. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *British Journal of Dermatology*. 2009;160(2):311-8.
132. Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Lago EL, Cuba CC, Barreto AC, Costa JM, et al. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil. An area of *Leishmania braziliensis* transmission. III-Mucosal disease presentation and initial evolution. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1984;17(4):179-86.
133. Meneses AMd. Perfil epidemiológico, clínico e terapêutico dos pacientes com a forma mucosa de leishmaniose tegumentar americana, atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, no período de 1989 a 2004 2007.

134. da Costa DC, Palmeiro MR, Moreira JS, Martins AC, da Silva AF, Madeira Mde F, et al. Oral manifestations in the American tegumentary leishmaniasis. *PLoS One*. 2014;9(11):e109790.
135. Boaventura VS, Cafe V, Costa J, Oliveira F, Bafica A, Rosato A, et al. Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;75(2):267-9.
136. Ito MM, Catanhêde LM, Katsuragawa TH, Junior S, Camargo LMA, Mattos RdG, et al. Correlation between presence of *Leishmania* RNA virus 1 and clinical characteristics of nasal mucosal leishmaniasis. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 2015;81(5):533-40.
137. 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.
138. Ruas ACN, Lucena MM, da Costa AD, Vieira JR, de Araújo-Melo MH, Terceiro BRF, et al. Voice disorders in mucosal leishmaniasis. *PloS one*. 2014;9(7):e101831.
139. Mota LAA, Miranda RR. Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. *Arq Int Otorrinolaryngol*. 2011;15(3):376-81.
140. 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.
141. 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.
142. Aquino F. Estudo estatístico das formas mucosas da leishmaniose no serviço de Oto-Rinolaringologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, com considerações de ordem profilática *Revista Brasileira de otorrinolaringologia* 1945;13(2):105-21.
143. Lessa H, Carvalho E, Marsden P. Eustachian tube blockage with consequent middle ear infection in mucosal leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1994;27(2):103-.
144. Araujo-Melo M, Meneses A, Schubach A, Moreira J, Conceição-Silva F, Salgueiro M, et al. Risk factors associated with dizziness during treatment of mucosal leishmaniasis with meglumine antimoniate: 16-year retrospective study of cases from Rio de Janeiro, Brazil. *The Journal of laryngology and otology*. 2010;124(10):1056.
145. Silveira FT. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2019;113(9):505-16.
146. Nishino L, Ragiotta AR, Almeida NA, Santamaria JR. Leishmaniose em crianças. *An bras dermatol*. 1986;61(1):23-8.
147. 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-.
148. 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.
149. 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.
150. 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.
151. Theodoro FCET. Diferenciação entre as formas cutânea e mucosa da leishmaniose tegumentar americana a partir de características clínico epidemiológicas e exames imunológicos em área endêmica de *L. (V.) braziliensis*. 2016.
152. Boggild AK, Valencia BM, Veland N, Pilar Ramos A, Calderon F, Arevalo J, et al. Non-Invasive Cytology Brush PCR Diagnostic Testing in Mucosal Leishmaniasis: Superior Performance to Conventional Biopsy with Histopathology. *PLOS ONE*. 2011;6(10):e26395.
153. 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.
154. Furtado T. Immunology of american leishmaniasis. *International journal of dermatology*. 1973;12(2):88-94.
155. Wagener EH. A skin reaction to extracts of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum*. 1923;20(22):477-88.

156. 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.
157. 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.
158. 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.
159. 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.
160. 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.
161. 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.
162. Schnorr D, Muniz AC, Passos S, Guimaraes LH, Lago EL, Bacellar O, et al. IFN- γ production to leishmania antigen supplements the leishmania skin test in identifying exposure to L. braziliensis infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(12):e1947.
163. 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.
164. Dostrovsky A, Sagher F. The intracutaneous test in cutaneous leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 1946;40(3-4):265-9.
165. 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.
166. Guedes DC, Pasquali AKS, Minozzo JC, Faulds C, Pettele RR, Soccol CR, et al. Biological evaluation of mimetic peptides as active molecules for a new and simple skin test in an animal model. *Parasitology research*. 2019;118(1):317-24.
167. Akuffo H, Darce M, Maasho K, Berhan TY. In vivo evaluation of immune responses in leishmaniasis: the use of cross-species leishmanin preparations for skin testing. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1995;53(1):16-22.
168. de Vries HJ, Reedijk SH, Schallig HD. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *American journal of clinical dermatology*. 2015;16(2):99-109.
169. Weigle KA, Valderrama L, Arias AL, Santrich C, Saravia NG. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1991;44(3):260-71.
170. 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.
171. 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.
172. 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.
173. Furtado TA, Pellegrino J. Intradermal Test in American Leishmaniasis with a Polysaccharide Fraction Isolated from Leishmania Brasilensis1. *Journal of Investigative Dermatology*. 1956;27(2):53-9.
174. Restrepo Isaza M. La reacción de Montenegro en la epidemiología de la leishmaniasis sudamericana. 1980.
175. de Castro LCM, Rotta O, Cucé LC. Intradermorreação de Montenegro em doentes com tuberculose. *An bras Dermatol*. 1980;55(2):79-80.
176. Smrkovski L, Larson C. Antigenic cross-reactivity between Mycobacterium bovis (BCG) and Leishmania donovani. *Infection and immunity*. 1977;18(2):561.
177. 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.

178. 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.
179. Minaya-Gómez G, Vargas-Apaza S, Monteza-Zuloeta Y, Purisaca-Morante E, Delgado-Diaz 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.
180. 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.
181. Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical reviews in microbiology*. 1995;21(2):123-52.
182. 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.
183. 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.
184. 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.
185. Casavechia MTG, Silveira TGV, Teodoro U, Janeiro V, Udo M, Campana Lonardoni 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.
186. 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.
187. 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.
188. 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.
189. Furtado T. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. *An Bras Dermatol*. 1980;55(2):81-6.
190. 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.
191. 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.
192. 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.
193. 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.
194. Amato VS, DUARTE MIS, Nicodemo AC, Carvalho LVd, Pagliari C, MATTA VLRd, et al. An evaluation of clinical, serologic, anatomopathologic and immunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1998;40(1):23-30.
195. 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.
196. da Silva ED, de Oliveira BC, Pereira AMdS, Guedes DL, de Melo Neto OP, Costa CH, et al. A flow cytometry-based serological assay to detect Visceral Leishmaniasis in HIV-infected patients. *Frontiers in Medicine*. 2021;8.

197. Kip AE, Balasegaram M, Beijnen JH, Schellens JH, de Vries PJ, Dorlo TP. Systematic review of biomarkers to monitor therapeutic response in leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(1):1-14.
198. Yoneyama KA, de Peder LD, Lonardon 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.
199. Bracamonte ME, Álvarez AM, Sosa AM, Hoyos CL, Lauthier JJ, Cajal SP, et al. High performance of an enzyme linked immunosorbent assay for American tegumentary leishmaniasis diagnosis with *Leishmania (Viannia) braziliensis* amastigotes membrane crude antigens. *PloS one*. 2020;15(5):e0232829.
200. 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.
201. ul Bari A, Azam S, Ejaz A, Mahmood T. Comparison of various cytodiagnostic tests in the rapid diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Pakistan Association of Dermatology*. 2016;20(2):63-9.
202. 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.
203. 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.
204. 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.
205. 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.
206. 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.
207. 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.
208. 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.
209. Thakur S, Joshi J, Kaur S. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *Journal of Parasitic Diseases*. 2020;44(2):253-72.
210. Dorta ML, Oliveira MA, Fleuri AK, Duarte FB, Pinto SA, Pereira LI, et al. Improvements in obtaining New World *Leishmania* sp from mucosal lesions: notes on isolating and stocking parasites. *Exp Parasitol*. 2012;132(2):300-3.
211. 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.
212. Moreira OC, Yadon ZE, Cupolillo E. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: current status and perspectives. *Acta tropica*. 2018;184:29-37.
213. le Fichoux Y, Quaranta J-F, Aueuvre J-P, Lelievre A, Marty P, Suffia I, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(6):1953-7.
214. León CM, Muñoz M, Hernández C, Ayala MS, Flórez C, Teherán A, et al. Analytical performance of four polymerase chain reaction (PCR) and real time PCR (qPCR) assays for the detection of six *Leishmania* species DNA in Colombia. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:1907.
215. Martínez-Valencia AJ, Daza-Rivera CF, Rosales-Chilama M, Cossio A, Rincón EJC, Desai MM, et al. Clinical and parasitological factors in parasite persistence after treatment and clinical cure of cutaneous leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(7):e0005713.

216. de Almeida ME, Steurer FJ, Koru O, Herwaldt BL, Pieniazek NJ, da Silva AJ. Identification of *Leishmania* spp. by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of rRNA internal transcribed spacer 2. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(9):3143-9.
217. 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.
218. 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.
219. 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.
220. 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.
221. Laskay T, Mikó TL, Negesse Y, Solbach W, Rölinghoff 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.
222. Adams ER, Gomez MA, Scheske L, Rios R, Marquez R, Cossio A, et al. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. *Parasitology*. 2014;141(14):1891-7.
223. Canário A, Queiroz M, Cunha G, Cavalcante T, Riesz V, Sharma R, et al. Presence of parasite DNA in clinically unaffected nasal mucosa during cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019;25(4):515. e5- e7.
224. Jara M, Valencia BM, Alba M, Adauí V, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, editors. Quantitative kDNA assessment during treatment of mucosal leishmaniasis as a potential biomarker of outcome. Poster session presented at: 5th World Congress on Leishmaniasis (Worldleish5); 2013.
225. Dorta ML, Oliveira MA, Fleuri AK, Duarte FB, Pinto SA, Pereira LI, et al. Improvements in obtaining New World *Leishmania* sp from mucosal lesions: notes on isolating and stocking parasites. *Experimental parasitology*. 2012;132(2):300-3.
226. Roselino AM. Molecular biology in tropical dermatoses. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2008;83(3):187-203.
227. Medeiros A, Rodrigues S, Roselino A. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Brazilian journal of medical and biological research*. 2002;35(4):421-4.
228. Thatcher SA. DNA/RNA preparation for molecular detection. *Clinical chemistry*. 2015;61(1):89-99.
229. Buckingham L. *Molecular diagnostics: fundamentals, methods and clinical applications*: FA Davis; 2019.
230. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009;2009.
231. Miller S, Dykes D, Polesky H. Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res;(United Kingdom)*. 1988;16(3).
232. Ghatak S, Muthukumaran RB, Nachimuthu SK. A simple method of genomic DNA extraction from human samples for PCR-RFLP analysis. *Journal of biomolecular techniques: JBT*. 2013;24(4):224.
233. Ayoib A, Hashim U, Gopinath SC, Arshad MM. DNA extraction on bio-chip: history and preeminence over conventional and solid-phase extraction methods. *Applied microbiology and biotechnology*. 2017;101(22):8077-88.
234. Wilson ID. *Encyclopedia of separation science* 2000.
235. Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979;76(2):615-9.
236. Southern E. Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *Journal of molecular biology*. 1975;98(3):503-17.
237. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230(4732):1350-4.
238. Verweij JJ, Stensvold CR. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27(2):371-418.

239. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-91.
240. Keer J, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of microbiological methods*. 2003;53(2):175-83.
241. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*. 2006;27(2-3):95-125.
242. da Silva LA, de Sousa CdS, da Graça GC, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010;10(1):77-83.
243. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*. 1992;10(4):413-7.
244. 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.
245. Li W, Xi B, Yang W, Hawkins M, Schubart UK. Complex DNA melting profiles of small PCR products revealed using SYBR® Green I. *BioTechniques*. 2003;35(4):702-6.
246. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*. 1997;245(2):154-60.
247. Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotallevi A, Menotta M, Magnani M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites & vectors*. 2018;11(1):1-13.
248. Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Analytical biochemistry*. 2002;303(1):95-8.
249. Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M. Detection and characterization of *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. *PLoS One*. 2014;9(2):e88845.
250. Verweij J, Planting A, van der Burg M, Stoter G. A dose-finding study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in patients with metastatic solid tumours. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1992;118(8):606-8.
251. Tsukayama P, Núñez JH, De Los Santos M, Soberón V, Lucas CM, Matlashewski G, et al. A FRET-based real-time PCR assay to identify the main causal agents of New World tegumentary leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(1):e1956.
252. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular aspects of medicine*. 2017;57:1-29.
253. Sundar S, Singh OP. Molecular diagnosis of visceral leishmaniasis. *Molecular diagnosis & therapy*. 2018;22(4):443-57.
254. van Eys Guillaume J, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and biochemical parasitology*. 1992;51(1):133-42.
255. Foulet F, Botterel F, Buffet P, Morizot G, Rivollet D, Deniau M, et al. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome B gene. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(7):2110-5.
256. Llanes A, Restrepo CM, Del Vecchio G, Anguizola FJ, Leonart R. The genome of *Leishmania panamensis*: insights into genomics of the *L. (Viannia)* subgenus. *Scientific reports*. 2015;5(1):1-10.
257. Lukeš J, Guilbride DL, Votýpka J, Zíková A, Benne R, Englund PT. Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. *Eukaryotic Cell*. 2002;1(4):495-502.
258. Shlomai J. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Current molecular medicine*. 2004;4(6):623-47.
259. Stuart KD, Schnauffer A, Ernst NL, Panigrahi AK. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends in biochemical sciences*. 2005;30(2):97-105.
260. Sturm NR, Simpson L. *Leishmania tarentolae* minicircles of different sequence classes encode single guide RNAs located in the variable region approximately 150 bp from the conserved region. *Nucleic acids research*. 1991;19(22):6277-81.
261. Martinez-Calvillo S, Sunkin SM, Yan S-f, Fox M, Stuart K, Myler PJ. Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania* major Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Molecular and biochemical parasitology*. 2001;116(2):147-57.
262. Weirather JL, Jeronimo SMB, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, et al. Serial Quantitative PCR Assay for Detection, Species Discrimination, and Quantification of *Leishmania* spp. in Human Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(11):3892-904.

263. 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.
264. 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.
265. 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.
266. 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.
267. Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Clinics in dermatology*. 1999;17(3):297-304.
268. Choi CM, Lerner EA. Leishmaniasis: recognition and management with a focus on the immunocompromised patient. *Am J Clin Dermatol*. 2002;3(2):91-105.
269. 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.
270. 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.
271. Ridley D, Ridley MJ. The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. *The Journal of pathology*. 1983;141(1):83-96.
272. Kurizky PS, Marianelli FF, Cesetti MV, Damiani G, Sampaio RNR, Gonçalves LMT, et al. A comprehensive systematic review of leishmaniasis in patients undergoing drug-induced immunosuppression for the treatment of dermatological, rheumatological and gastroenterological diseases. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2020;62.
273. Motta ACF, Arruda D, Souza CS, Foss NT. Disseminated mucocutaneous leishmaniasis resulting from chronic use of corticosteroid. *International Journal of Dermatology*. 2003;42(9):703-6.
274. Gontijo CM, Pacheco RS, Oréfice F, Lasmar E, Silva ES, Melo MN. Concurrent cutaneous, visceral and ocular leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a kidney transplant patient. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002;97(5):751-3.
275. Tuon FF, Bombonato GM, Battaglin ER, Sakumoto MH, Amato VS, de Camargo RA, et al. Reactivation of mucosal and cutaneous leishmaniasis in a renal transplanted patient. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;91(1):81-3.
276. Alrajhi AA, Saleem M, Ibrahim EA, Gramiccia M. Leishmaniasis of the tongue in a renal transplant recipient. *Clin Infect Dis*. 1998;27(5):1332-3.
277. Souza RMD, Andrade Junior HFd, Duarte MIS, Braz LMA, Schubach AdO, Silva FC, et al. Reactivation of cutaneous and mucocutaneous tegumentary leishmaniasis in rheumatoid arthritis patients: an emerging problem? *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2017;59.
278. Garcia-Gonzalez E, Guidelli GM, Bardelli M, Maggio R. Mucocutaneous leishmaniasis in a patient treated with anti-TNF- α therapy. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51(8):1517-8.
279. Nicodemo AC, Duailibi DF, Feriani D, Duarte MIS, Amato VS. Mucosal leishmaniasis mimicking T-cell lymphoma in a patient receiving monoclonal antibody against TNF α . *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(9):e0005807.
280. Nicodemo AC, de Andrade HF, Muñoz Torres P, Amato VS. Secondary Prophylaxis with Liposomal Amphotericin B in a Patient with Mucosal Leishmaniasis Undergoing Immunobiological Therapy for Active Ankylosing Spondylitis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2019;101(2):402-3.
281. Sánchez P, Bosch RJ, de Gálvez MV, Rodrigo AB, Herrera E. Mucocutaneous leishmaniasis in a patient with the human immunodeficiency virus. *International journal of STD & AIDS*. 2001;12(10):687-9.
282. Da-Cruz AM, Filgueiras DV, Coutinho Z, Mayrink W, Grimaldi G, Jr., De Luca PM, et al. Atypical mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in an acquired immunodeficiency syndrome patient: T-cell responses and remission of lesions associated with antigen immunotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(4):537-42.
283. Sampaio RNR, Salaro CP, Resende P, Paula CDRd. Leishmaniose tegumentar americana associada à AIDS: relato de quatro casos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(6):651-4.
284. Amato VS, Tuon FF, Imamura R, Abegao de Camargo R, Duarte MI, Neto VA. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009;23(9):1026-34.

285. Mercadante LM, Santos M, Pegas ES, Kadunc BV. Leprosy and American cutaneous leishmaniasis coinfection. *An Bras Dermatol*. 2018;93(1):123-5.
286. Vernal S, Bueno-Filho R, Gomes CM, Roselino AM. Clinico-immunological spectrum of American tegumentary leishmaniasis and leprosy coinfection: A case series in Southeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019;52:e20180172.
287. Azeredo-Coutinho RBG, Matos DCS, Nery JAC, Valete-Rosalino CM, Mendonça SCF. Interleukin-10-dependent down-regulation of interferon-gamma response to *Leishmania* by *Mycobacterium leprae* antigens during the clinical course of a coinfection. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2012;45(7):632-6.
288. Guedes DC, Minozzo JC, Pasquali AKS, Faulds C, Soccol CR, Thomaz-Soccol V. New strategy to improve quality control of Montenegro skin test at the production level. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2017;50(6):788-94.
289. Júnior G, Pinheiro CR, Pimentel JVC, Teixeira Júnior AG, Jesus AFd, Galvão TCF, et al. American cutaneous leishmaniasis in a northeast Brazilian city: clinical and epidemiological features. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2018;51(6):837-42.
290. ANVISA. Antígeno de montenegro Consultas- ANVISA2018 [Available from: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/25351034160200354/>].
291. Braz LMA. Tegumentary leishmaniasis diagnosis: what happened with MST (Montenegro Skin Test) in Brazil? *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2019;61.
292. Guraya SY, London N, Guraya SS. Ethics in medical research. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 2014;2(3):121-6.
293. 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.
294. Loeuillet C, Bañuls A-L, Hide M. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. *Parasites & vectors*. 2016;9(1):1-12.
295. Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BAS, Moreira OC, et al. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. 2012;5(1):15.
296. Spinelli M, Cruz R, Godoy C, Motta M. Comparação dos parâmetros bioquímicos de camundongos criados em diferentes condições sanitárias. *Scientia Plena*. 2012;8(2).
297. Almeida AS, Faleiros ACG, Teixeira DNS, Cota UA, Chica JEL. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2008;44:429-32.
298. 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.
299. Porrozzì R, Teva A, Amaral VF, DA COSTA MVS, GRIMALDI G. Cross-immunity experiments between different species or strains of *Leishmania* in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2004;71(3):297-305.
300. Cuba CA, Marsden PD, Barretto AC, Jones TC, Richards F. The use of different concentrations of leishmanial antigen in skin testing to evaluate delayed hypersensitivity in American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1985;18(4):231-6.
301. Cuba CC, Llanos-Cuentas EA, Barreto AC, Magalhães AV, Lago EL, Reed SG, et al. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil: an area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. I. Laboratory diagnosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1984;17(4):161-7.
302. Reis ML, Ferreira VM, Zhang X, Goncalves R, Vieira LQ, Tafuri WL, et al. Murine immune response induced by *Leishmania major* during the implantation of paraffin tablets. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2010;457(5):609-18.
303. Cupolilo SM, Souza CS, Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Goncalves da Costa SC. Biological behavior of *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. *Histology and histopathology*. 2003;18(4):1059-65.
304. Barral A, Petersen EA, Sacks DL, Neva FA. Late metastatic Leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1983;32(2):277-85.
305. Fagundes A, Marzochi MC, Perez M, Schubach A, Ferreira A, Silva JP, et al. Skin reactivity to thimerosal and phenol-preserved Montenegro antigen in Brazil. *Acta tropica*. 2007;101(1):25-30.

306. Alimohammadian MH, Kojori ZF, Darabi H, Malekzadeh S, Yousef-Beig M, Irvani-Nia F. Soluble Leishmanin as an Ideal Reagent for Skin Testing in Human Leishmaniasis. *Iranian Biomedical Journal*. 1997;1(1):39-47.
307. Guedes ACM, Cucé LC, Furtado T. Avaliação imunológica e histopatológica da reação de Montenegro. *An Bras Dermatol*. 1990;65(5a, supl):34S-40S.
308. 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.
309. Wortmann GW, Aronson NE, Miller RS, Blazes D, Oster CN. Cutaneous leishmaniasis following local trauma: a clinical pearl. *Clinical infectious diseases*. 2000;31(1):199-201.
310. Martins SS, Santos AdO, Lima BD, Gomes CM, Sampaio RNR. American cutaneous leishmaniasis triggered by electrocoagulation. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2018;51:108-10.
311. Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(11):3892-904.
312. 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.
313. Hashemi SN, Mohebbali M, Mansouri P, Bairami A, Hajjaran H, Akhouni 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.
314. 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.
315. Cuba Cuba C, Marsden PD, Barreto AC, Rocha R, Sampaio RR, Patzlaff L. Parasitologic and immunologic diagnosis of American (mucocutaneous) leishmaniasis. 1981.
316. 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.
317. Manzur A. Sensitivity of leishmanin skin test in patients of acute cutaneous leishmaniasis. *Dermatology online journal*. 2006;12(4).
318. 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.
319. Pereira LdOR, Barbosa R. Is *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* parasite load. *World Health*. 2017;22(12):552-7.
320. 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.
321. Carvalho L, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RPd, Magalhaes A, et al. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite immunology*. 2007;29(5):251-8.
322. Conceição-Silva F, Leite-Silva J, Morgado FN. The binomial parasite-host immunity in the healing process and in reactivation of human tegumentary leishmaniasis. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:1308.
323. Fregni F, Illigens BM. Critical thinking in clinical research: applied theory and practice using case studies: Oxford University Press; 2018.
324. Travi B, Osorio Y, Saravia N. The inflammatory response promotes cutaneous metastasis in hamsters infected with *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*. *The Journal of parasitology*. 1996:454-7.
325. Lockard RD, Wilson ME, Rodríguez NE. Sex-Related Differences in Immune Response and Symptomatic Manifestations to Infection with *Leishmania* Species. *J Immunol Res*. 2019;2019:4103819.
326. Romero GA, Lessa HA, Macêdo Vde O, de Carvalho EM, Marsden PD. Delayed skin healing of cutaneous leishmaniasis after clinical cure of mucosal surfaces. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1996;29(3):285.
327. Nogueira R, Gomes-Silva A, Bittar R, Silva Mendonca D, Amato V, Silva Mattos M, et al. Antigen-triggered interferon- γ and interleukin-10 pattern in cured mucosal leishmaniasis patients is shaped during the active phase of disease. *Clinical & Experimental Immunology*. 2014;177(3):679-86.

328. Ávila LR, Gomes CM, Oliveira PG, Gomes RS, Vinaud MC, Dorta ML, et al. Promastigote parasites cultured from the lesions of patients with mucosal leishmaniasis are more resistant to oxidative stress than promastigotes from a cutaneous lesion. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018;129:35-45.
329. Martínez-López M, Soto M, Iborra S, Sancho D. Leishmania Hijacks Myeloid Cells for Immune Escape. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9(883).
330. 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.
331. Forestier CL. Imaging host–Leishmania interactions: significance in visceral leishmaniasis. *Parasite immunology*. 2013;35(9-10):256-66.
332. De Pablos L, Ferreira T, Walrad P. Developmental differentiation in *Leishmania* lifecycle progression: post-transcriptional control conducts the orchestra. *Current opinion in microbiology*. 2016;34:82-9.
333. Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and molecular pathology*. 2002;72(2):132-41.
334. No JH. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta tropica*. 2016;155:113-23.
335. Lieke T, Nylen S, Eidsmo L, Schmetz C, Berg L, Akuffo H. The interplay between *Leishmania* promastigotes and human Natural Killer cells in vitro leads to direct lysis of *Leishmania* by NK cells and modulation of NK cell activity by *Leishmania* promastigotes. *Parasitology*. 2011;138(14):1898.
336. Beattie L, Kaye PM. *Leishmania*–host interactions: what has imaging taught us? *Cellular microbiology*. 2011;13(11):1659-67.
337. Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature medicine*. 2006;12(2):220-4.
338. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 2008;321(5891):970-4.
339. Forestier C-L, Machu C, Loussert C, Pescher P, Späth GF. Imaging host cell–*Leishmania* interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. *Cell host & microbe*. 2011;9(4):319-30.
340. Martínez JE, Valderrama L, Gama V, Leiby DA, Saravia NG. Clonal diversity in the expression and stability of the metastatic capability of *Leishmania guyanensis* in the golden hamster. *Journal of Parasitology*. 2000;86(4):792-9.
341. Tavares J, Costa DM, Teixeira AR, Cordeiro-da-Silva A, Amino R. In vivo imaging of pathogen homing to the host tissues. *Methods*. 2017;127:37-44.
342. Marsden PD. Leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*. 1979;300(7):350-2.
343. Callahan HL, Portal IF, Bensinger SJ, Grogl M. Leishmaniasis: Temperature Sensitivity of Promastigotes in Vitro as a Model for Tropism in Vivo. *Experimental parasitology*. 1996;84(3):400-9.
344. Lindemann J, Keck T, Wiesmiller K, Sander B, Brambs HJ, Rettinger G, et al. A numerical simulation of intranasal air temperature during inspiration. *The Laryngoscope*. 2004;114(6):1037-41.
345. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2(11):845-58.
346. Paludan SR, Pradeu T, Masters SL, Mogensen TH. Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. *Nature Reviews Immunology*. 2021;21(3):137-50.
347. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
348. Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone A, Fathman CG, et al. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *The Journal of experimental medicine*. 1989;169(3):1169-78.
349. Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1978;75(10):5132-6.
350. Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11(1):47-59.
351. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Advances in immunology*. 1998;70:83-243.
352. Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 2002;20(1):197-216.
353. Dunkelberger JR, Song W-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research*. 2010;20(1):34-50.

354. Carroll MC. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature immunology*. 2004;5(10):981-6.
355. Lachmann P, Hughes-Jones N, editors. *Initiation of complement activation*. Springer seminars in immunopathology; 1984: Springer.
356. Gurung P, Kanneganti TD. Innate immunity against *Leishmania* infections. *Cellular microbiology*. 2015;17(9):1286-94.
357. Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature immunology*. 2002;3(11):1041-7.
358. Domínguez M, Moreno I, López-Trascasa M, Toraño A. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *The Journal of experimental medicine*. 2002;195(4):451-9.
359. Franco LH, Beverley SM, Zamboni DS. Innate immune activation and subversion of mammalian functions by *Leishmania* lipophosphoglycan. *Journal of parasitology research*. 2012;2012.
360. Joshi PB, Kelly BL, Kamhawi S, Sacks DL, McMaster WR. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Molecular and biochemical parasitology*. 2002;120(1):33-40.
361. Neto ALC, Brito AN, Rezende AM, Magalhães FB, de Melo Neto OP. In silico characterization of multiple genes encoding the GP63 virulence protein from *Leishmania braziliensis*: identification of sources of variation and putative roles in immune evasion. *BMC genomics*. 2019;20(1):1-17.
362. McConville MJ, Turco SJ, Ferguson M, Sacks DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *The EMBO journal*. 1992;11(10):3593-600.
363. Ambrosio AR, Bavia L, Borges BS, Hiraiwa PM, Pietsch JLM, da Costa Ribeiro MCV, et al. Novel findings on the role of ficolins and collectins in the innate response against *Leishmania braziliensis*. *Acta Tropica*. 2020;212:105673.
364. Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, AIMusawi T, Duarte MI, Neto VA. Toll-Like Receptors and Leishmaniasis. *Infection and Immunity*. 2008;76(3):866-72.
365. Manicassamy S, Pulendran B, editors. *Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors*. *Seminars in immunology*; 2009: Elsevier.
366. Soong L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *The Journal of Immunology*. 2008;180(7):4355-60.
367. 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.
368. Faria MS, Reis FC, Lima APC. Toll-like receptors in leishmania infections: guardians or promoters? *Journal of parasitology research*. 2012;2012.
369. 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.
370. Ashour DS. Toll-like receptor signaling in parasitic infections. *Expert review of clinical immunology*. 2015;11(6):771-80.
371. Tuon FF, Fernandes ER, Duarte MIS, Amato VS. The expression of TLR2, TLR4 and TLR9 in the epidermis of patients with cutaneous leishmaniasis. *Journal of dermatological science*. 2010;59(1):55-7.
372. Tuon FF, Fernandes ER, Duarte MIS, Amato VS. Expressão de TLR2 e TLR4 em lesões de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2012;54(3):159-64.
373. Tuon F, Fernandes E, Pagliari C, Duarte M, Amato V. The expression of TLR9 in human cutaneous leishmaniasis is associated with granuloma. *Parasite immunology*. 2010;32(11-12):769-72.
374. Vargas-Inchaustegui DA, Tai W, Xin L, Hogg AE, Corry DB, Soong L. Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. *Infection and immunity*. 2009;77(7):2948-56.
375. Nicodemo AC, Amato V, Miranda A, FLOETER-WINTER L, Zampieri R, Fernandes E, et al. Are the severe injuries of cutaneous leishmaniasis caused by an exacerbated Th1 response? *Parasite immunology*. 2012;34(8-9):440-3.
376. Ronet C, Beverley SM, Fasel N. Muco-cutaneous leishmaniasis in the New World: the ultimate subversion. *Virulence*. 2011;2(6):547-52.
377. Pereira LdOR, Maretti-Mira AC, Rodrigues KM, Lima RB, Oliveira-Neto MPd, Cupolillo E, et al. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with *Leishmania* RNA virus 1 infection in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013;108(5):665-7.

378. 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.
379. Vieira TdS, Rugani JN, Nogueira PM, Torrecilhas AC, Gontijo CMF, Descoteaux A, et al. Intraspecies polymorphisms in the lipophosphoglycan of *L. braziliensis* differentially modulate macrophage activation via TLR4. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2019;9:240.
380. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual review of immunology*. 1995;13(1):251-76.
381. Feng G-J, Goodridge HS, Harnett MM, Wei X-Q, Nikolaev AV, Higson AP, et al. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania* phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *The Journal of Immunology*. 1999;163(12):6403-12.
382. Jain A, Pasare C. Innate control of adaptive immunity: beyond the three-signal paradigm. *The Journal of Immunology*. 2017;198(10):3791-800.
383. Bogdan C, Donhauser N, Döring R, Röllinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(12):2121-30.
384. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9(8):604-15.
385. Van Assche T, Deschacht M, da Luz RAI, Maes L, Cos P. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;51(2):337-51.
386. Carvalho EM, Carvalho LP, Passos S, Schriefer A. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Frontiers in immunology*. 2012;3:301.
387. Liew FY. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(1):55-60.
388. 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.
389. 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.
390. 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.
391. Zhou X, Khan SG, Tamura D, Patronas NJ, Zein WM, Brooks BP, et al. Brittle hair, developmental delay, neurologic abnormalities, and photosensitivity in a 4-year-old girl. *J Am Acad Dermatol*. 2010;63(2):323-8.
392. Janeway CA, editor *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology; 1989: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
393. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(8):486-99.
394. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(4):227-42.
395. Jain A, Song R, Wakeland EK, Pasare C. T cell-intrinsic IL-1R signaling licenses effector cytokine production by memory CD4 T cells. *Nature communications*. 2018;9(1):1-13.
396. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual review of immunology*. 2009;28:445-89.
397. 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.
398. 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.
399. 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.
400. Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC. Mucosal leishmaniasis: Current scenario and prospects for treatment. *Acta Tropica*. 2008;105(1):1-9.
401. Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, de Andrade J, Dos Santos WL, Clarêncio J, et al. Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *European journal of immunology*. 2010;40(10):2830-6.

402. 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.
403. Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infection and immunity*. 2005;73(12):7853-9.
404. Brodskyn CI, Barral A, Boaventura V, Carvalho E, Barral-Netto M. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. 1997;159(9):4467-73.
405. Tuon FF, Gomes-Silva A, Da-Cruz AM, Duarte MIS, Neto VA, Amato VS. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. *Clinical Immunology*. 2008;128(3):442-6.
406. Carvalho AM, Guimarães LH, Costa R, Saldanha MG, Prates I, Carvalho LP, et al. Impaired Th1 Response Is Associated With Therapeutic Failure in Patients With Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *The Journal of Infectious Diseases*. 2021;223(3):527-35.
407. 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.
408. Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(6).
409. Murphy K, Travers P, Walport M. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 9th2017.
410. Albert-Vega C, Tawfik DM, Trouillet-Assant S, Vachot L, Mallet F, Textoris J. Immune functional assays, from custom to standardized tests for precision medicine. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2367.
411. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *European journal of immunology*. 2007;37(S1):S34-S45.
412. Da-Cruz AM, de Oliveira MP, De Luca PM, Mendonca SC, Coutinho SG. Tumor necrosis factor- α in human american tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996;91(2):225-9.
413. de Jager W, Hoppenreijns EP, Wulffraat NM, Wedderburn LR, Kuis W, Prakken BJ. Blood and synovial fluid cytokine signatures in patients with juvenile idiopathic arthritis: a cross-sectional study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007;66(5):589-98.
414. Kreiner F, Langberg H, Galbo H. Increased muscle interstitial levels of inflammatory cytokines in polymyalgia rheumatica. *Arthritis & Rheumatism*. 2010;62(12):3768-75.
415. De Kleijn DP, Moll FL, Hellings WE, Ozsarlak-Sozer G, De Bruin P, Doevendans PA, et al. Local atherosclerotic plaques are a source of prognostic biomarkers for adverse cardiovascular events. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(3):612-9.
416. Kan AA, de Jager W, de Wit M, Heijnen C, van Zuiden M, Ferrier C, et al. Protein expression profiling of inflammatory mediators in human temporal lobe epilepsy reveals co-activation of multiple chemokines and cytokines. *Journal of Neuroinflammation*. 2012;9(1):1-22.
417. Ricker LJ, Kijlstra A, Kessels AG, De Jager W, Liem AT, Hendrikse F, et al. Interleukin and growth factor levels in subretinal fluid in rhegmatogenous retinal detachment: a case-control study. *PLoS one*. 2011;6(4):e19141.
418. Granath A, Norrby-Teglund A, Uddman R, Cardell LO. Reduced iNOS expression in adenoids from children with otitis media with effusion. *Pediatric allergy and immunology*. 2010;21(8):1151-6.
419. Jochems SP, Piddock K, Rylance J, Adler H, Carniel BF, Collins A, et al. Novel analysis of immune cells from nasal microbiopsy demonstrates reliable, reproducible data for immune populations, and superior cytokine detection compared to nasal wash. *PLoS one*. 2017;12(1):e0169805.
420. Tateosian NL, Costa MJ, Guerrieri D, Barro A, Mazzei JA, Chuluyan HE. Inflammatory mediators in exhaled breath condensate of healthy donors and exacerbated COPD patients. *Cytokine*. 2012;58(3):361-7.
421. Switala S, Lauenstein L, Prenzler F, Knothe S, Förster C, Fieguth H-G, et al. Natural innate cytokine response to immunomodulators and adjuvants in human precision-cut lung slices. *Toxicology and applied pharmacology*. 2010;246(3):107-15.
422. Netea MG, Balkwill F, Chonchol M, Cominelli F, Donath MY, Giamarellos-Bourboulis EJ, et al. A guiding map for inflammation. *Nature Immunology*. 2017;18(8):826-31.
423. Keustermans GC, Hoeks SB, Meerding JM, Prakken BJ, de Jager W. Cytokine assays: an assessment of the preparation and treatment of blood and tissue samples. *Methods*. 2013;61(1):10-7.
424. Sapsford KE, Težak Ž, Kondratovich M, Pacanowski MA, Zineh I, Mansfield E. Biomarkers to improve the benefit/risk balance for approved therapeutics: a US FDA perspective on personalized medicine. *Therapeutic delivery*. 2010;1(5):631-41.

425. Halminen M, Sjöroos M, Mäkelä MJ, Waris M, Terho E, Lövgren T, et al. SIMULTANEOUS DETECTION OF IFN- γ AND IL-4 mRNAs USING RT-PCR AND TIME-RESOLVED FLUOROMETRY. *Cytokine*. 1999;11(1):87-93.
426. Junior GSM, Kurizky PS, Cerqueira SRPS, Barroso DH, Schulte HL, de Albuquerque CP, et al. Enhanced IL-6 and IL-12B Gene Expression After SARS-CoV-2 Infection in Leprosy Patients May Increase the Risk of Neural Damage. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2021;104(6):2190.
427. Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *Journal of immunological methods*. 1995;188(1):117-28.
428. Barroso DH, Falcao SAC, da Motta JOC, Sevilha Dos Santos L, Takano GHS, Gomes CM, et al. PD-L1 May Mediate T-Cell Exhaustion in a Case of Early Diffuse Leishmaniasis Caused by *Leishmania (L.) amazonensis*. *Front Immunol*. 2018;9:1021.
429. Saldanha MG, Pagliari C, Queiroz A, Machado PRL, Carvalho L, Scott P, et al. Tissue damage in human cutaneous leishmaniasis: correlations between inflammatory cells and molecule expression. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;10.
430. de Jager W, Bourcier K, Rijkers GT, Prakken BJ, Seyfert-Margolis V. Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays. *BMC immunology*. 2009;10:52.
431. Oertelt-Prigione S. The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmunity Reviews*. 2012;11(6):A479-A85.
432. ter Horst R, Jaeger M, Smeekens SP, Oosting M, Swertz MA, Li Y, et al. Host and Environmental Factors Influencing Individual Human Cytokine Responses. *Cell*. 2016;167(4):1111-24. e13.
433. Zhou X, Fragala MS, McElhaney JE, Kuchel GA. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2010;13(5):541.
434. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Adv Sci (Weinh)*. 2021;8(15):e2004433.
435. Marques Filho JS, Gobara J, da Silva Salomao GV, Sumita LM, Shibli JA, Viana RG, et al. Cytokine levels and human herpesviruses in saliva from clinical periodontal healthy subjects with peri-implantitis: a case-control study. *Mediators of inflammation*. 2018;2018.
436. Jackman RP, Utter GH, Heitman JW, Hirschhorn DF, Law JP, Gefter N, et al. Effects of blood sample age at time of separation on measured cytokine concentrations in human plasma. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2011;18(2):318-26.
437. Carreño E, Enríquez-de-Salamanca A, Tesón M, García-Vázquez C, Stern ME, Whitcup SM, et al. Cytokine and chemokine levels in tears from healthy subjects. *Acta ophthalmologica*. 2010;88(7):e250-e8.
438. Radtke S, Wüller S, Yang X-p, Lippok BE, Mütze B, Mais C, et al. Cross-regulation of cytokine signalling: pro-inflammatory cytokines restrict IL-6 signalling through receptor internalisation and degradation. *Journal of cell science*. 2010;123(6):947-59.
439. Mahmoud L, Al-Enezi F, Al-Saif M, Warsy A, Khabar KS, Hitti EG. Sustained stabilization of Interleukin-8 mRNA in human macrophages. *RNA biology*. 2014;11(2):124-33.
440. Riis JL, Out D, Dorn LD, Beal SJ, Denson LA, Pabst S, et al. Salivary cytokines in healthy adolescent girls: Intercorrelations, stability, and associations with serum cytokines, age, and pubertal stage. *Developmental psychobiology*. 2014;56(4):797-811.
441. Kleiner G, Marcuzzi A, Zanin V, Monasta L, Zauli G. Cytokine levels in the serum of healthy subjects. *Mediators of inflammation*. 2013;2013.
442. Srinivasan L, Harris MC, Kilpatrick LE. 128 - Cytokines and Inflammatory Response in the Fetus and Neonate. In: Polin RA, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE, Fox WW, editors. *Fetal and Neonatal Physiology (Fifth Edition)*: Elsevier; 2017. p. 1241-54.e4.
443. Kuribayashi T. Elimination half-lives of interleukin-6 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 synthesized in response to inflammatory stimulation in rats. *Laboratory animal research*. 2018;34(2):80-3.
444. Vanegas SM, Meydani M, Barnett JB, Goldin B, Kane A, Rasmussen H, et al. Substituting whole grains for refined grains in a 6-wk randomized trial has a modest effect on gut microbiota and immune and inflammatory markers of healthy adults. *The American journal of clinical nutrition*. 2017;105(3):635-50.
445. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000;117(4):1162-72.
446. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical pharmacology*. 2009;78(6):539-52.
447. APUD, Oliver J, Bland L, Oettinger C, Arduino M, McAllister S, et al. Cytokine kinetics in an in vitro whole blood model following an endotoxin challenge. *Lymphokine and cytokine research*.

- 1993;12(2):115-20 como citado em "Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Adv Sci (Weinh)*. 2021;8(15):e2004433."
448. Wieder ED. Real-time monitoring of immune responses. *Cytotherapy*. 2002;4(4):347-52.
449. Lindemann M. Ex vivo assessment of cellular immune function - applications in patient care and clinical studies. *Tissue Antigens*. 2014;84(5):439-49.
450. 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.
451. Li Y, Oosting M, Deelen P, Ricano-Ponce I, Smeekens S, Jaeger M, et al. Inter-individual variability and genetic influences on cytokine responses to bacteria and fungi. *Nature medicine*. 2016;22(8):952-60.
452. Giese C, Marx U. Human immunity in vitro—Solving immunogenicity and more. *Advanced drug delivery reviews*. 2014;69:103-22.
453. Campos M, Godson DL. The effectiveness and limitations of immune memory: understanding protective immune responses. *International journal for parasitology*. 2003;33(5-6):655-61.
454. Panus JF, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific T helper cell function: differential cytokine expression in primary and memory responses. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(9):1301-16.
455. Lainson R, Bray R. Studies on the immunology and serology of leishmaniasis II. Cross-immunity experiments among different forms of American cutaneous leishmaniasis in monkeys. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1966;60(4):526-32.
456. Silva TF, Tomiotto-Pellissier F, Pasquali AKS, Pinto-Ferreira F, Pavanelli WR, Conchon-Costa I, et al. Phenotypical and genotypical differences among *Leishmania (Leishmania) amazonensis* isolates that caused different clinical frames in humans and dogs: A systematic review. *Acta Trop*. 2021;221:106018.
457. Teva A, Porrozzi R, Cupolillo E, Pirmez C, Oliveira-Neto MP, Grimaldi G, Jr. *Leishmania (Viannia) braziliensis*-induced chronic granulomatous cutaneous lesions affecting the nasal mucosa in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model. *Parasitology*. 2003;127(Pt 5):437-47.
458. Oliveira MAPd, Pires AdS, Bastos RPd, Lima GMCdA, Pinto SA, Pereira LidA, et al. *Leishmania* spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2010;52:83-8.
459. Rice J. Animal models: Not close enough. *Nature*. 2012;484(7393):S9-S.
460. Leist M, Hartung T. Inflammatory findings on species extrapolations: humans are definitely no 70-kg mice. *Archives of toxicology*. 2013;87(4):563-7.
461. Stebbings R, Findlay L, Edwards C, Eastwood D, Bird C, North D, et al. "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. *The Journal of Immunology*. 2007;179(5):3325-31.
462. Jepsen P, Johnsen SP, Gillman M, Sørensen H. Interpretation of observational studies. *Heart*. 2004;90(8):956-60.
463. Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, de Jesus AR, Filho DC, Filho AC, et al. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*. 1999;180(5):1731-4.
464. Unger A, O'Neal S, Machado PR, Guimarães LH, Morgan DJ, Schriefer A, et al. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009;80(4):574-9.
465. Maretti-Mira AC, Bittner J, Oliveira-Neto MP, Liu M, Kang D, Li H, et al. Transcriptome patterns from primary cutaneous *Leishmania braziliensis* infections associate with eventual development of mucosal disease in humans. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(9):e1816.
466. Grimes DA, Schulz KF. Surrogate end points in clinical research: hazardous to your health. *Obstetrics & Gynecology*. 2005;105(5):1114-8.
467. Gomes CM. Acurácia da reação em cadeia da polimerase em amostras de saliva, swab nasal e papel filtro oral no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, revisão sistemática da literatura e meta-análise. 2014.
468. Zou G. A modified poisson regression approach to prospective studies with binary data. *Am J Epidemiol*. 2004;159(7):702-6.
469. O'Garra A, Vieira P. TH 1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(6):425-8.
470. 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.

471. Castes M, Trujillo D, Rojas ME, Fernandez CT, Araya L, Cabrera M, et al. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biol Res.* 1993;26(1-2):233-8.
472. Bernink JH, Peters CP, Munneke M, te Velde AA, Meijer SL, Weijer K, et al. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol.* 2013;14(3):221-9.
473. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells: 10 years on. *Cell.* 2018;174(5):1054-66.
474. Rodríguez OL, Lugo DA, Cabrera M, Sánchez MA, Zerpa O, Tapia FJ. Innate lymphoid cells in peripheral blood of patients with American Cutaneous Leishmaniasis. *Exp Dermatol.* 2021;30(7):982-7.
475. da Silva Vieira T, Arango Duque G, Ory K, Gontijo CM, Soares RP, Descoteaux A. *Leishmania braziliensis*: Strain-Specific Modulation of Phagosome Maturation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:319.
476. Gomes CM, Avila LR, Santos JC, Oliveira PG, Tome FD, Pereira LI, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* amastigotes from patients with mucosal leishmaniasis have increased ability to disseminate and are controlled by nitric oxide at the early stage of murine infection. *Pathogens and disease.* 2016;74(4).
477. Moreira RB, Pirmez C, Oliveira-Neto D, Paes M, De Souza Aguiar L, Da Silva Gonçalves AJ, et al. AIM2 inflammasome is associated to disease severity in tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) braziliensis*. *Parasite immunology.* 2017.
478. Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, Magalhaes A, Guimaraes LH, Lessa M, et al. IL6- 174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *The Journal of infectious diseases.* 2006;194(4):519-27.
479. Osorio Y, Melby PC, Pirmez C, Chandrasekar B, Guarín N, Travi BL. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. *Parasite Immunol.* 2003;25(3):139-48.
480. Oliveira FS, Valete-Rosalino CM, Pacheco SJ, Costa FAC, Schubach AO, Pacheco RS. American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*: assessment of parasite genetic variability at intra-and inter-patient levels. 2013.
481. Mandell MA, Beverley SM. Continual renewal and replication of persistent *Leishmania* major parasites in concomitantly immune hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2017;114(5):E801-E10.
482. Saunders EC, Ng WW, Kloehn J, Chambers JM, Ng M, McConville MJ. Induction of a stringent metabolic response in intracellular stages of *Leishmania mexicana* leads to increased dependence on mitochondrial metabolism. *PLoS pathogens.* 2014;10(1):e1003888.
483. Yehia L, Adib-Houreh 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.
484. Ramesh V, Katara G, Verma S, Salotra P. Miltefosine as an effective choice in the treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Br J Dermatol.* 2011;165(2):411-4.
485. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *Journal of clinical microbiology.* 2004;42(11):5249-55.
486. Sheridan G, Szabo E, Mackey B. Effect of post-treatment holding conditions on detection of tufa mRNA in ethanol-treated *Escherichia coli*: implications for RT-PCR-based indirect viability tests. *Letters in applied microbiology.* 1999;29(6):375-9.
487. Mohapatra S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. *Tropical parasitology.* 2014;4(1):4.
488. Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes and Infection.* 2007;9(11):1307-15.
489. Disch J, Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. *Acta tropica.* 2004;92(3):279-83.
490. McCarty SC, Atlas RM. Effect of amplicon size on PCR detection of bacteria exposed to chlorine. *Genome Research.* 1993;3(3):181-5.
491. Jara M, Berg M, Caljon G, de Muylder G, Cuyper B, Castillo D, et al. Macromolecular biosynthetic parameters and metabolic profile in different life stages of *Leishmania braziliensis*: Amastigotes as a functionally less active stage. *PLOS ONE.* 2017;12(7):e0180532.
492. Schubach A, Marzochi M, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira A, et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1998;58(6):824-7.

493. Mirzabeigi M, Farooq U, Baraniak S, Dowdy L, Ciancio G, Vincek V. Reactivation of dormant cutaneous Leishmania infection in a kidney transplant patient. *Journal of cutaneous pathology*. 2006;33(10):701-4.
494. Franklin G, Greenspan J, Chen S. Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy provokes latent leishmaniasis in a patient with rheumatoid arthritis. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2009;39(2):192-5.
495. González-Escalona N, Fey A, Höfle MG, Espejo RT, A. Guzmán C. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock. *Environmental microbiology*. 2006;8(4):658-66.
496. Manual I. Human Inflammatory Cytokines Kit. 2008.
497. Oliveira JGS, Novais FO, de Oliveira CI, da Cruz Junior AC, Campos LF, da Rocha AV, et al. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta tropica*. 2005;94(1):55-9.
498. van den Bogaart E, Schoone GJ, Adams ER, Schallig HD. Duplex quantitative reverse-transcriptase PCR for simultaneous assessment of drug activity against *Leishmania* intracellular amastigotes and their host cells. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2014;4(1):14-9.
499. Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde. Leishmaniose Tegumentar. *Boletim Epidemiológico Doenças Tropicais Negligenciadas Número especial Mar 2021*. p. 65-74
500. Biegel D, Topper G, Rabinovitch M. *Leishmania mexicana*: temperature sensitivity of isolated amastigotes and of amastigotes infecting macrophages in culture. *Experimental parasitology*. 1983;56(3):289-97.
501. Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, de Moraes Gonçalves JL. Modeling monthly mean air temperature for Brazil. *Theoretical and applied climatology*. 2013;113(3):407-27.
502. Figueroa RA, Lozano LE, Romero IC, Cardona MT, Prager M, Pacheco R, et al. Detection of *Leishmania* in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) species. *The Journal of infectious diseases*. 2009;200(4):638-46.
503. Motulsky H. *Intuitive biostatistics: a nonmathematical guide to statistical thinking*. Fourth edition ed: Oxford University Press, USA; 2018.
504. Costa RS, Carvalho LP, Campos TM, Magalhães AS, Passos ST, Schriefer A, et al. Early cutaneous leishmaniasis patients infected with *Leishmania braziliensis* express increased inflammatory responses after antimony therapy. *The Journal of infectious diseases*. 2018;217(5):840-50.
505. Oliveira F, Bafica A, Rosato AB, Favali CB, Costa JM, Cafe V, et al. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;85(1):70-3.
506. Antonelli LRV, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunology letters*. 2005;101(2):226-30.
507. Saldanha MG, Queiroz A, Machado PRL, de Carvalho LP, Scott P, de Carvalho Filho EM, et al. Characterization of the Histopathologic Features in Patients in the Early and Late Phases of Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;96(3):645-52.
508. Harms G, Fraga F, Batroff B, Oliveira F, Feldmeier H. Cutaneous leishmaniasis associated with extensive lymphadenopathy during an epidemic in Ceara State, northeast Brazil. *Acta tropica*. 2005;93(3):303-10.
509. Venazzi E, Roberto A, Barbosa-Tessmann I, Zanzarini P, Lonardon M, Silveira T. Detection of *Leishmania* (*Viannia*) DNA in blood from patients with American cutaneous leishmaniasis. *Experimental parasitology*. 2007;115(4):399-402.
510. Martinez JE, Arias AL, Escobar MA, Saravia NG. Haemoculture of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from two cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1992;86(4):392-4.

6.APÊNDICE

6.1 APÊNDICE I- 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 rastreamento 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 realizados 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

6.2 APÊNDICE II TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“PRESENÇA DE ALTERAÇÕES OTORRINOLARINGOLÓGICAS COMO FATOR DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DA LEISHMANIOSE MUCOSA: UM ESTUDO CASO-CONTROLE”

O (a) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) de uma pesquisa e deve autorizar ou não a sua participação. Para auxiliá-lo (a) nessa decisão, atente para os esclarecimentos feitos logo abaixo. Caso aceite fazer parte do estudo, assine no local indicado no documento. Se o (a) senhor (a) preferir não autorizar a sua participação na pesquisa, saiba que não haverá nenhuma penalidade. A Participação nesta pesquisa também não acarretará em gastos para o senhor (a). Esta pesquisa se propõe a associação entre a presença de rinite alérgica e o surgimento de leishmaniose mucosa em pacientes com Leishmaniose cutânea. Além disso avaliará os tipos de alterações de mucosa nos pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana do Hospital Universitário de Brasília. Isso será feito através de avaliação detalhada que será realizada por médicos dermatologistas e otorrinolaringologistas, descrevendo os sinais e sintomas relativos a estas lesões, bem como as suas evoluções com o tempo de tratamento. Com essas informações serão obtidos estudos atuais sobre as alterações otorrinolaringológicas nos pacientes com leishmaniose e a prevalência destes sintomas, fornecendo dados que contribuirão no aprimoramento do conhecimento, possibilitarão avaliar os critérios diagnósticos adotados, acreditando que os médicos devem ser capazes de reconhecer os sintomas e suspeitar da doença, evitando assim a continuidade de transmissão da leishmaniose e a formação de sequelas deformantes.

As consultas médicas, juntamente com o preenchimento das fichas e o exame físico serão realizados as quartas-feiras no ambulatório específico para Leishmaniose Tegumentar Americana no Hospital Universitário de Brasília seguido pelo atendimento no ambulatório especializado de Otorrinolaringologia.

Os seus dados serão mantidos em segurança e sua identificação só será reconhecida pelos pesquisadores envolvidos, e se em algum momento, o (a) senhor (a) não desejar mais participar da pesquisa pode retirar seu consentimento e isso não implicará em qualquer prejuízo na continuidade do acompanhamento e de seu tratamento. O seu consentimento permitirá o melhor desenvolvimento da assistência prestada e outros benefícios já citados, além disso essa pesquisa não oferece nenhum risco ou prejuízo à sua saúde. Se houver alguma dúvida sobre esse projeto, pode procurar algum(a) dos (as) pesquisadores(a)s, Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, no telefone: (61) 8121-6100; Daniel Holanda Barroso no telefone: (61) 98591155 ou pode buscar o Comitê de Ética em Pesquisa localizado na Universidade de Brasília na Faculdade Medicina ou pelo telefone (61) 3107-1918, ou pelo e-mail cepfm@unb.br.

Eu, _____, portadora do RG ou CPF n.º _____, na condição de responsável pela criança _____, concordo em participar da pesquisa “PRESENÇA DE ALTERAÇÕES OTORRINOLARINGOLÓGICAS COMO FATOR DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DA LEISHMANIOSE MUCOSA: UM ESTUDO CASO-CONTROLE”.

Assinatura do(a) responsável: _____

Pesquisadora Responsável: Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio

Pesquisadoras participantes: Daniel Holanda Barroso.

♦ Nome e Assinatura do pesquisador: _____

Agradecemos a sua disposição e participação.

6.3 APÊNDICE III- FICHA OTORRINOLARINGOLÓGICA DE LTA

Anexo II- Avaliação Otorrinolaringológica do paciente com LTA

Nome: _____

Data: _____ Nº Prontuário HUB: _____ Suspeita LTA: 1- Cutânea; 2- Mucosa; 3-Cutaneo-mucosa

Início de Lesões cutâneas(meses): _____ Início de lesões mucosas(meses): _____

História de doença ORL: 1-Sim; 2- Não Caso positivo, Qual? _____

Rinite alérgica: 1-Sim; 2- Não Uso de Corticoterapia tópica prévia? 1-Sim; 2- Não

Rinorréia: 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses Prurido nasal 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses

Congestão Nasal: 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses Espirros: 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses

Sintomas Otorrinolaringológicos

Sintomas orais/Faríngeos Dor Oral: 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses Dor faríngea: 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses

Odinofagia: 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses Globus faríngeo: 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses

Disfagia: Início: _____ meses

Sintomas laringeos: Disfonia: 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses Tosse: 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses

Pigarro: 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses

Sintomas Nasais: Obstrução: 1-Sim; 2- Não Lateralidade: 1- Direita; 2- Esquerda Início: _____ meses

Rinorréia: 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses Presença de crostas: 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses

Epistaxe: 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses Cacosmia: 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses

Dor nasal: 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses Fluxo Ruidoso (apito): 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses

Dispepsia 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses Tratamento 1-Sim; 2- Não Qual? _____

Tabagismo: 1-Sim; 2- Não Início: _____ meses

Exame físico:

Oroscopia: Lesões: 1-Sim; 2- Não

Otoscopia: Lesões: 1-Sim; 2- Não

Rinoscopia/Videoendoscopia nasal: Lesões: 1-Sim; 2- Não

Videolaringoscopia: Lesões: 1-Sim; 2- Não

Avaliação e Conduta otorrinolaringológicas

6.4 APÊNDICE IV FICHA DERMATOLÓGICA DE LTA

Ficha Dermatológica de LTA	
Data: _____	Nº Prontuário HUB: _____
Suspeita LTA: <input type="checkbox"/> 1- Cutânea; 2- Mucosa; 3- Cutâneo-mucosa	
1- Identificação	
Nome: _____	
Endereço: _____	
Telefone: _____	Celular: _____
Sexo: <input type="checkbox"/> 1-Masc e 2-Fem	Data de Nascimento: _____
Idade: _____ anos	Fototipo: _____
CEP: _____	Número do SUS: _____
Escolaridade: <input type="checkbox"/> 1- Analfabeto; 2 alfabetizado; 3-Fundamental(1-4ª série); 4- Fundamental(5-8ª série) 5- Ensino médio; 6-Ensino superior; 7- Pós graduação	
Naturalidade: _____	Profissão: _____
Procedencia: _____	
2-Histórico Epidemiológico	
Procedente de Área: <input type="checkbox"/> 1-Urbana; 2- Periurbana e 3- Rural	Residências anteriores _____
Convívio com animais: <input type="checkbox"/> 1-Sim; 2- Não	Quais? _____
Hábitos Recreativos: <input type="checkbox"/> 1- Nenhum; 2-Caça; 3- Pesca; 4- Outros Quais?	_____
Local de Provável contágio: _____	
Alguma Atividade no campo <input type="checkbox"/> 1-Sim; 2- Não	Há quanto tempo? _____ meses Local: _____
Contato próximo com LTA? <input type="checkbox"/> 1-Sim; 2- Não	Parentesco: _____
Há quanto tempo _____ meses	Tratado <input type="checkbox"/> 1-Sim; 2- Não
3-História da moléstia atual:	

Exame físico:

Local da Biópsia:

Hipótese diagnóstica:

Conduta

Tabagismo 1-Sim; 2- Não Cigarros por dia: Há quantos anos?
 Etilismo 1-Sim; 2- Não Vezes por semana: Quantidade por vez¹- Latas: Doses: Taças:
 Uso de drogas 1-Sim; 2- Não Vezes por semana: Quantidade por vez: _____
 Diabetes Mellitus 1-Sim; 2- Não Hipertensão arterial 1-Sim; 2- Não
 Alergias 1-Sim; 2- Não Quais? _____
 Cardiopatia 1-Sim; 2- Não Nefropatia: 1-Sim; 2- Não Pneumopatias: 1-Sim; 2- Não
 HIV/AIDS 1-Sim; 2- Não Outras Imunodeficiências? _____ Outros: _____
 Doença de Chagas: 1-Sim; 2- Não Hanseníase: 1-Sim; 2- Não Tuberculose cutânea: 1-Sim; 2- Não
 Penfigo foleáceo sul americano 1-Sim; 2- Não Doença reumática: 1-Sim; 2- Não
 Micose profunda: 1-Esporotricose; 2- Cromoblastomicose; 3- Paracoccidioidomicose

1-Latas de cerveja, Doses de destilado e taças de vinho, Obs: nas células que não houver nada escrito segue o padrão: 1= sim e 2=Não.

5-Sinais e Sintomas

Lesões cutâneas: Número total: Localização: Face: Asa nasal: Dorso nasal:
 Labios: Orelha: Pescoço: Torax: Membros superiores: Membros inferiores:
 Abdomen Região Lombar
 Aspecto: 1-Úlcera; 2- Pápula; 3- Verrucosa; 4- Esporotricóide; 5- outros- Descrição: _____
 Tempo da lesão: _____ meses Obs: _____

Lesões Mucosas: 1-Sim; 2- Não.

Obstrução nasal: Sangramentos: Dor: Coriza: Dificuldade para deglutir: Secreção nasa
 Dificuldade para Respirar: Crostas: Prurido:
Exame físico: Úlcera nasal: Infiltração N: Deformidade externa nasal: Perfuração do Septo nasal:
 Destruição Septal Total: Fístula Orofaringea: Utilização de Protese: Lesão da cavidade oral:
 Lesão cutânea concomitante: Local:
 Cicatriz ou lesão cutânea prévia: Tipo: 1- Infiltração; 2- Úlcera; 3- Outro: _____

6-Exames complementares (0- Não realizada; 1- Positivo e 2- Negativo)

Sorologias

HIV: Anti-HBs: HBsAg: Anti-Hbe: HBeAg:
 Anti-HBc- Total: IgG: IgM: Anti-HCV: Anti-HAV- IgM: IgG:
 VDRL: Chagas:

Reação em cadeia da polimerase:

Saliva: Sangue periférico: Swab Oral:
 Lesão Cutânea- Fragmento de lesão: Papel filtro: Bloco de parafina:
 Lesão Mucosa- Fragmento de lesão: Papel filtro: Bloco de parafina:

Rotina LTA:

IDRM: Inoculação em Hamster: Imunofluorescência indireta LTA:
 Cultura LTA: Esfregaço LTA:
 Cultura para Fungos:
 Cultura para Micobactérias:
 PCR para fungos ou Micobactérias:

6.5 APÊNDICE V- ARTIGOS PUBLICADOS POR ORIENTADORA E ESTUDANTE NO PERÍODO

1. Barroso, Daniel Holanda, Jurema Guerrieri Brandão, Elaine Silva Nascimento Andrade, Ana Clara Banhatta Correia, Danielle Costa Aquino, Ana Carolina Rios Chen, Sebastian Vernal, Wildo Navegantes de Araújo, Lícia Maria Henrique da Mota, and Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio. 2021. 'Leprosy detection rate in patients under immunosuppression for the treatment of dermatological, rheumatological, and gastroenterological diseases: a systematic review of the literature and meta-analysis', *BMC infectious diseases*, 21: 1-9.
2. Barroso, Daniel Holanda, Ciro Martins Gomes, Antônia Marilene da Silva, and Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio. 2021. 'Comparison of cardiotoxicity between N-methyl-glucamine and miltefosine in the treatment of American cutaneous leishmaniasis', *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 96: 502.
3. Barroso, Daniel Holanda, Otávio de Toledo Nóbrega, Carla Nunes de Araújo, Gustavo Subtil Magalhães Freire, Sofia Sales Martins, Bruna Côrtes Rodrigues, Ciro Martins Gomes, and Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio. 2021. 'The Presence of *Leishmania braziliensis* DNA in the Nasal Mucosa of Cutaneous Leishmaniasis Patients and the Search for Possible Clinical and Immunological Patterns of Disease Progression: A Cross Sectional Study', *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11.
4. Martins, Sofia Sales, Daniel Holanda Barroso, Bruna Côrtes Rodrigues, Jorgeth de Oliveira Carneiro da Motta, Gustavo Subtil Magalhães Freire, Ledice Inácia de Araújo Pereira, Patrícia Shu Kurisky, Ciro Martins Gomes, and Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio. 2021. 'A Pilot Randomized Clinical Trial: Oral Miltefosine and Pentavalent Antimonials Associated With Pentoxifylline for the Treatment of American Tegumentary Leishmaniasis', *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11.
5. Pinheiro, Ana Bárbara Sapienza, Patricia Shu Kurizky, Marina de Freitas Ferreira, Marco Antonio de Souza Mota, Jaqueline Santos Ribeiro, Edson Zuza de Oliveira Filho, Carlos Augusto Souza, Daniel Holanda Barroso, Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, and Ciro Martins Gomes. 2020. 'The accuracy of the Montenegro skin test for leishmaniasis in PCR-negative patients', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53.

6. Rodrigues, Bruna Côrtes, Marina Freitas Ferreira, Daniel Holanda Barroso, Jorgeth Oliveira Carneiro da Motta, Carmen Déa Ribeiro de Paula, Cláudia Porto, Sofia Sales Martins, Ciro Martins Gomes, and Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio. 2020. 'A retrospective cohort study of the effectiveness and adverse events of intralesional pentavalent antimonials in the treatment of cutaneous leishmaniasis', *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14: 257-63.

7. Sampaio, Raimunda Nonata Ribeiro, Carmen Dea Ribeiro de Paula, Cláudia Porto, Jorgeth de Oliveira Carneiro da Motta, Ledice Inácia de Araújo Pereira, Sofia Sales Martins, Daniel Holanda Barroso, Gustavo Subtil Magalhães Freire, and Ciro Martins Gomes. 2019. 'A randomized, open-label clinical trial comparing the long-term effects of miltefosine and meglumine antimoniate for mucosal leishmaniasis', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52.