

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Caracterização de biomarcadores imunológicos circulantes e presentes na lesão de pacientes com leishmaniose cutânea localizada que atendem aos critérios para tratamento com Glucantime®

Por

Jaqueline Paulino de Souza

Belo Horizonte

2022

Jaqueline Paulino de Souza

Caracterização de biomarcadores imunológicos circulantes e presentes na lesão de pacientes com leishmaniose cutânea localizada que atendem aos critérios para tratamento com Glucantime®

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciências da saúde do instituto René Rachou, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em ciências da saúde – área de concentração doenças infecciosas e parasitárias

Orientação: Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal
Coorientação: Dra. Agnes Antônia Sampaio Pereira

Belo Horizonte
2022

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB 6 3740/00

S985c
2022

Souza, Jaqueline Paulino de.

Caracterização de biomarcadores imunológicos circulantes e presentes na lesão de pacientes com leishmaniose cutânea localizada que atendem aos critérios para tratamento com Glucantime®/ Jaqueline Paulino de Souza. – Belo Horizonte, 2022

XIV, 97f., il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 75-83

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis.

1. Leishmaniasis Cutânea Difusa. 2. terapia intralesional/tratamento farmacológico. 3. Antimoniato de Meglumina/uso terapêutico. 4. I. Título. II. Pascoal, Vanessa Peruhype Magalhães (Orientação) III. Pereira, Agnes Antônia Sampaio.

CDD – 22. ed. – 616.93

Jaqueline Paulino de Souza

Caracterização de biomarcadores imunológicos circulantes e presentes na lesão de pacientes com leishmaniose cutânea localizada que atendem aos critérios para tratamento com Glucantime®

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciências da saúde do instituto René Rachou, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em ciências da saúde – área de concentração doenças infecciosas e parasitárias

Banca Examinadora

Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal	IRR – FIOCRUZ MINAS (Presidente)
Dra. Juliana Martins Ribeiro	IRR – FIOCRUZ MINAS (Titular)
Dra. Fernanda Ludolf Ribeiro	UFMG (Titular)
Dra. Kelly Alves Bicalho	IRR – FIOCRUZ MINAS (Suplente)

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 01/09/2022

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por todas as realizações e seu inesgotável amor e a Nossa Senhora por estar sempre intercedendo por nós e ter permitido a realização desse estudo mesmo em meio as dificuldades.

À minha família por todo apoio, meu pai, minha irmã e minha tia por acreditarem na minha capacidade e compreender os momentos de ausência. Em especial agradeço a minha mãe, que será minha eterna inspiração, sempre acreditou em mim, e hoje só me resta a saudade de sua presença.

Aos pacientes que se dispuseram a contribuir para o estudo, sem os quais não seria possível sua realização.

À minha orientadora Dra. Vanessa Peruhype por me aceitar como aluna. Sou grata pela confiança, paciência e por todo aprendizado adquirido ao longo desses anos desde quando eu era apoio técnico.

À minha coorientadora Dra. Agnes Sampaio por ter me recebido gentilmente como sua aluna, pelos incentivos e por me proporcionar novas oportunidades de conhecimento e me auxiliar nas resoluções dos problemas.

À Dra. Jordana Reis pelo imenso incentivo no início dessa jornada sem me deixar desistir. Sou imensamente grata! Agradeço também a Jucélia Amorim pelo incentivo e apoio.

Ao Dr. Marcelo Pascoal pela contribuição e disposição em participar desse estudo.

Ao Dr. Hugo Moreira e aos voluntários pela disposição e contribuição ao presente estudo.

À Dra. Andréia Teixeira e ao Dr. Olindo Assis pela oportunidade de fazer parte do grupo.

A todos os colegas do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) e ao Grupo de estudos em leishmaniose (GEL) que contribuíram de alguma forma para realização desse grande projeto.

Às minhas amigas Júlia Martins, Nathália Werneck, Tamilla Mayane, Maria Luiza (Malu), Luana Fernandes, Victória Pereira, Thalles Lopes, Ismael Artur e Bruna Diniz pelos momentos de amizade e parceria e ensinamentos.

À toda a equipe da Secretaria Estadual de Saúde, a Superintendência Regional de Saúde e a Secretaria Municipal de Saúde de Teófilo Otoni pelo interesse e apoio ao projeto. Agradeço também a Dra. Marcela Eller, Francislane Pereira, Maria Nilza e Adelaide da Policlínica Municipal de Teófilo Otoni.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse projeto e para o meu crescimento profissional.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Instituto René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade ofertada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento APQ-02182-18.

Resumo

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma clínica mais prevalente da leishmaniose tegumentar (LT) no Brasil. A resolução da doença depende do equilíbrio do sistema imunológico do hospedeiro, que aliado ao tratamento, aumentam as chances de cura. O tratamento no Brasil é realizado predominantemente com Glucantime® que pode ser administrado por duas vias: endovenosa e intralesional. Não há trabalhos acerca do perfil de resposta imune apresentado pelos pacientes que apresentam perfil clínico compatível para realizar tratamento intralesional. Nesse sentido, o estudo propôs avaliar o perfil de mediadores imunológicos do sangue periférico e exsudato inflamatório da lesão de pacientes com LCL antes do início do tratamento com Glucantime® intralesional que tiveram desfecho de cura clínica. Para isso, os níveis de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento foram quantificados utilizando o kit Bio-Plex Pro Human Cytokine 27 em amostras de sangue periférico e do exsudato inflamatório de indivíduos sem lesão cutânea (SL), pacientes com lesões cutâneas de origem não leishmaniótica (NL) e casos confirmados de LCL submetidos ao tratamento endovenoso (LC-EV) ou intralesional (LC-IL). No grupo NL a presença de alto produtores de fatores de crescimento circulantes é observada. Por outro lado, o grupo LC-EV apresentou perfil de lesão ligeiramente modulada, com produção de CCL4, IL-1Ra, IL-9 e IL-10, enquanto o grupo LC-IL foi mais inflamatório, com alta produção de CXCL10, IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ e baixa de IL-10. Pela análise do diagrama de Venn, foi possível observar o compartilhamento de 9 biomarcadores sistêmicos e 23 do microambiente da lesão entre LC-EV e LC-IL. No entanto, no grupo LC-EV houve intensa correlação apenas entre os biomarcadores circulantes, havendo perda de conexões quando avaliados no exsudato inflamatório e o oposto foi observado no grupo LC-IL. Os resultados mostram que os pacientes que atendem aos critérios para terapia intralesional apresentam perfil imunológico diferenciado que pode ser favorável ao controle do parasito e resposta ao tratamento. Referente ao tempo de lesão, foram verificados menores níveis de CXCL8, CCL3, TNF, IFN- γ e GM-CSF em pacientes do grupo LC-IL com lesões recentes. Na assinatura observou-se a presença de alto produtores de citocinas moduladoras. Já na análise do diagrama de Venn, 5 e 17 biomarcadores foram exclusivos em lesões recentes e tardias, respectivamente. No entanto, maior número de conexões fortes foram observadas em pacientes com lesões recentes. O estudo de mediadores imunológicos pode ser uma ferramenta importante para protocolos de recomendação da terapia intralesional que além de reduzir custos para o tratamento, possui baixa toxicidade.

Palavras-chave: leishmaniose cutânea localizada; terapia intralesional; Glucantime®; perfil imunológico.

Abstract

Localized cutaneous leishmaniasis (LCL) is the most prevalent clinical form of cutaneous leishmaniasis (TL) in Brazil. The resolution of the disease depends on the equilibrium of the host's immune system, which, combined with treatment, increases the chances of being healed. Treatment in Brazil is predominantly performed with Glucantime®, that can be administered in two different ways: intravenous and intralesional ones. There hasn't been previous studies between the immune response profile presented by patients who present a compatible clinical profile to undergo intralesional treatment. Based on that, this study has proposed to evaluate the immunological mediators' of peripheral blood and lesion exudate of patients with LCL before starting treatment with intralesional Glucantime® who had a clinical cure outcome. This way, the levels of chemokines, cytokines and growth factors were quantified using the Bio-Plex Pro Human Cytokine 27 kit in peripheral's samples blood and inflammatory exudate from individuals without any skin lesions (WL), patients with skin lesions of non-leishmaniasis (NL) and confirmed cases of CL submitted to intravenous (CL-IV) or intralesional (CL-IL) treatment. In NL group the presence of high producers of circulating growth factors is observed. On the other hand, the CL-EV group shows a slightly modulated lesion profile, with production of CCL4, IL-1Ra IL-9 and IL-10, while the CL-IL group was more inflammatory, with high production of CXCL10, IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ and low production of IL-10. In the Venn diagram analysis, 9 systemic biomarker's and 23 sites were shared between CL-IV and CL-IL. However, in the CL-IV group there was an intense correlation only between the circulating biomarker's, with loss of connections when evaluated in the inflammatory exudate and the opposite was observed in the LC-IL group. The results reveal that patients who meet the criteria for intralesional therapy have a unique immunological profile that may be favorable in combating the parasite and responding to treatment. Regarding the time of lesion, it was found lower levels of CXCL8, CCL3, TNF, IFN- γ and GM-CSF in patients from CL-IL group with recent lesions. In the signature, was observed the presence of high producers of modulating cytokines. In the Venn diagram analysis, 5 and 17 biomarkers are unique in recent and late lesions, respectively. However, a higher number of strong correlations was observed in patients with recent lesions. The study of immune system's indicators could be an important tool for recommending protocols for intralesional therapy which, in addition to reducing treatment costs, has low toxicity.

Keywords: localized cutaneous leishmaniasis; intralesional therapy; Glucantime®; immunological profile.

Lista de Figuras

Figura 1: Localização geográfica do município de Teófilo Otoni.....	32
Figura 2: Procedimento de coleta e armazenamento do fragmento de biópsia.....	36
Figura 3: Fluxograma representado a metodologia utilizada no estudo.....	36
Figura 4: Perfil de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e moduladoras, e fatores de crescimento no plasma de indivíduos saudáveis e com lesão cutânea.....	43
Figura 5: Perfil de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e moduladoras, e fatores de crescimento no exsudato inflamatório de indivíduos saudáveis e com lesão cutânea.....	45
Figura 6: Panorama global de biomarcadores em pacientes com lesões cutâneas.....	47
Figura 7: Diagrama de Venn de biomarcadores em pacientes com lesões cutâneas.....	49
Figura 8: Matrix de Correlação de Biomarcadores.....	51
Figura 9: Perfil de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e moduladoras, e fatores de crescimento no plasma de indivíduos submetidos a terapia intralesional classificados por tempo de lesão.....	53
Figura 10: Perfil de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e moduladoras, e fatores de crescimento no exsudato inflamatório de indivíduos submetidos a terapia intralesional classificados por tempo de lesão.....	55
Figura 11: Panorama global de biomarcadores em pacientes submetidos a terapia intralesional classificados por tempo de lesão.....	57
Figura 12: Diagrama de Venn de biomarcadores em pacientes submetidos a terapia intralesional classificados por tempo de lesão.....	59
Figura 13: Matrix de Correlação de Biomarcadores em pacientes submetidos a terapia intralesional classificados por tempo de lesão.....	61
Figura 14: Figura representativa das principais diferenças encontradas no perfil de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento circulantes e presentes no microambiente da lesão dos pacientes submetidos ao tratamento com Glucantime® endovenoso (LC-EV) e intralesional (LC-IL).....	68
Figura 15: Figura representativa das principais diferenças encontradas no perfil de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento circulantes e presentes no microambiente da lesão de pacientes selecionados para tratamento com Glucantime® intralesional, classificados por tempo de lesão.....	70

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características dos grupos do estudo.....	34
--	----

Lista de abreviaturas e símbolos

°C – Grau Celsius

µL – microlitros

µm - micrômetro

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCs – *Antigen-Presenting Cell* - Células Apresentadoras de Antígeno

ATP – Adenosina Trifosfato

CAAE - Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

CCL - Ligante de Quimiocinas CC

CPPI - Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos

CD – Grupo de Diferenciação

CRL - Centro de Referência em Leishmanioses

CXCL - Ligante de Quimiocina CXC

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* - Ácido Desoxirribonucleico

DTN - Doença Tropical Negligenciada

EGF - *Epidermal Growth Factor* - Fator de Crescimento Epidermal

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimático

FGF - *Fibroblast Growth Factor* - Fator Crescimento de Fibroblastos

g - grama

G-CSF - *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* - Fator estimulador de colônia de granulócitos humano

GM-CSF - *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* - Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos-Macrófagos

gp - glicoproteínas

HE - Hematoxilina-Eosina

HLA-DR - *Human Leukocyte Antigen DR isotype* - Antígeno Leucocitário Humano isotipo DR

IDRM - Intradermorreação de Montenegro

IFN - Interferon

IL - Interleucina

iNOS – Enzima Óxido Nítrico Sintase induzível

IRR - Instituto René Rachou

kDNA - kinetoplast DNA (DNA do cinetoplasto)

Kg - Quilograma

LAMP - Amplificação Isotérmica Mediada por Loop

LC - Leishmaniose Cutânea

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

LC-EV – Pacientes com leishmaniose cutânea localizada tratados com Glucantime® endovenoso

LC-EV-E – Exsudato inflamatório de pacientes com leishmaniose cutânea localizada tratados com Glucantime® endovenoso

LC-EV-P – Plasma de pacientes com leishmaniose cutânea localizada tratados com Glucantime® endovenoso

LC-IL – Pacientes com leishmaniose cutânea localizada tratados com Glucantime® intralesional

LC-IL- E – Exsudato inflamatório de pacientes com leishmaniose cutânea localizada tratados com Glucantime® intralesional

LC-IL- P – Plasma de pacientes com leishmaniose cutânea localizada tratados com Glucantime® intralesional

LCL - Leishmaniose Cutânea Localizada

LD - Leishmaniose Cutânea Disseminada

LIT - Liver Infusion Triptose

LM - Leishmaniose Mucosa

LPG - Lipofosfoglicano

LPS – Lipopolissacarídeo

IL-LR - Lesão recente de pacientes com leishmaniose cutânea localizada tratados com Glucantime® intralesional

IL-LR-P – Plasma de pacientes com lesões tardias de leishmaniose cutânea localizada tratados com Glucantime® intralesional

LT - Leishmaniose Tegumentar

IL-LT – Lesão tardia de pacientes com leishmaniose cutânea localizada tratados com Glucantime® intralesional

IL-LT-E – Exsudato inflamatório de pacientes com lesões tardias leishmaniose cutânea localizada tratados com Glucantime intralesional

LV - Leishmaniose Visceral

mg - miligramas

MHC - *Major Histocompatibility Complex* - Complexo Principal de Histocompatibilidade

mL – mililitros

mm² – Milímetro quadrado

MS – Ministério da Saúde

MST – Teste de Montenegro

N/A – Não se aplica

NET's - *Neutrophil Extracellular Traps* - Redes Extracelulares de Neutrófilos

NK – *Natural Killer* - Células Matadoras Naturais

NL – Grupo com lesão não leishmaniótica

NNN - Novy-MacNeal-Nicolle

NO - *Nitric Oxide* - Óxido Nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

Pb – Pares de base

PBS - *Phosphate-Buffered Saline* - Tampão Fosfato Salino 0,015M, pH 7,2-7,4

PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells* - Células Polimorfonucleares do Sangue Periférico

PCR - *Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase

PDGF - *Platelet-Derived Growth Factor* - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

pg – picograma

pH – Potencial Hidrogeniônico

PM – peso molecular

POP - Procedimento Operacional Padrão

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição

RNA - *RiboNucleic Acid* - Ácido Ribonucleico

ROS – *Reactive Oxygen Species* - Espécies Reativas de Oxigênio

rpm – rotação por minuto

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*

RT-qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real

Sb^(III) - Antimônio Trivalente

Sb⁺⁵ - Antimoniato Pentavalente

SFB - Soro Fetal Bovino

SINAN-NET - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SL – Controle sem lesão cutânea

SUS - Sistema Único de Saúde

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF - *Transforming Growth Factor* - Fator de Transformação do Crescimento

TLR - *Toll-Like Receptors* - Receptor Toll Like

TNF – *Tumor Necrosis Factor* - Fator de Necrose Tumoral

VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor* - Fator de Crescimento Endotelial
Vascular

WHO - World Health Organization – Organização Mundial da Saúde

β - Beta

γ – Gamma

Sumário

1. Introdução.....	15
1.1 Aspectos gerais das leishmanioses	15
1.2 Formas clínicas da leishmaniose cutânea	16
1.3 Aspectos imunopatológicos e biomarcadores associados à leishmaniose cutânea	17
1.4 Diagnóstico da leishmaniose cutânea.....	21
1.5 Tratamento da LT.....	24
1.6 Tratamento da LT com Antimoniato de meglumina (Glucantime®)	25
2. Justificativa	29
3. Objetivo.....	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
4. Materiais e métodos.....	32
4.1 Área de estudo.....	32
4.2 Aspectos éticos	32
4.3 Caracterização da população avaliada	33
4.3.1 Critérios de inclusão e exclusão para indivíduos do grupo controle sem lesão cutânea (SL).....	34
4.3.2 Critérios de inclusão e exclusão para indivíduos com lesão não leishmaniótica (NL)	35
4.3.3 Critérios de inclusão e exclusão para pacientes com LCL (LC-EV e LC-IL)	35
4.4 Coleta e destinação das amostras	35
4.5 Diagnóstico dos casos suspeitos para LCL	37
4.6 Diagnóstico diferencial por histopatologia	37
4.7 Avaliação do perfil de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento presentes no plasma e no exsudato inflamatório	38
4.8 Estratégias de análise	39
5. Resultados.....	41
5.1 Avaliação do perfil de biomarcadores imunológicos presentes no plasma e no exsudato inflamatório de pacientes com lesões cutâneas	41

5.2 Análise comparativa da assinatura ascendente de biomarcadores em pacientes com lesões cutâneas	46
5.3 Análise de atributos compartilhados e exclusivos em pacientes com lesões cutâneas	48
5.4 Matriz de correlações dos biomarcadores em pacientes com lesões cutâneas	50
5.5 Avaliação do perfil de biomarcadores imunológicos presentes no plasma e no exsudato inflamatório de pacientes tratados com Glucantime® intralesional por tempo de lesão	52
5.6 Análise comparativa da assinatura ascendente de biomarcadores em pacientes tratados com Glucantime® intralesional por tempo de lesão.....	56
5.7 Análise de atributos compartilhados e exclusivos em pacientes tratados com Glucantime® intralesional por tempo de lesão	58
5.8 Matriz de correlações dos biomarcadores em pacientes tratados com Glucantime® intralesional por tempo de lesão	60
6. Discussão	62
7. Conclusão.....	74
8. Referencias.....	75
9. Apêndice.....	84
10. Anexos	89

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

A leishmaniose é uma doença zoonótica, não contagiosa, causada por protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). A ocorrência da doença está relacionada a áreas de pobreza e escassez de recursos humanos e econômicos para seu controle, sendo considerada uma doença tropical negligenciada (DTN). A leishmaniose recebe duas classificações clínicas básicas: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) (VASCONCELOS, et. al., 2018; ALVES, et. al., 2018). Por sua vez, a LT, de acordo com Marzochi & Marzochi (1994A), é classificada conforme a resposta do hospedeiro, a partir do local da picada do vetor, a localização das lesões e a evolução clínica em: leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM).

Estima-se que cerca de 0,7 a 1,2 milhões de indivíduos são acometidos pela LT anualmente em todo o mundo. Em 2020, 59 países (66%) foram considerados endêmicos para LT (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Segundo dados publicados pela *World Health Organization/Organização Mundial de Saúde (WHO/OMS)* (2019), 84% do total de casos de LT foram relatados no Brasil (16.432), Colômbia (6.362), Peru (6.321), Nicarágua (3.722), Bolívia (3.127) e Venezuela (2.612). A LT é responsável por cerca de 90% dos casos de leishmaniose no Brasil e as principais espécies envolvidas são *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019, 2020; ALVES, 2014).

A *L. (V.) braziliensis* é a principal espécie envolvida nos casos de lesões cutâneas e mucosas no Brasil. Foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita e atribuída como agente etiológico da LT (VIANNA; 1911; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Essa espécie tem ampla distribuição desde a América Central até o norte da Argentina. No Brasil, o parasito já foi isolado em roedores silvestres, felídeos, marmota, canídeos e equídeos, entretanto ainda não é bem descrito o papel desses animais no ciclo de transmissão (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994B; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

1.2 Formas clínicas da leishmaniose cutânea

A leishmaniose cutânea apresenta-se em 3 formas clínicas principais: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada (LD) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994B). Essas diferentes formas clínicas da LC refletem a complexa interação parasito-hospedeiro, onde a resposta imune do hospedeiro e a virulência da espécie de *Leishmania* infectante, destacam-se como fatores de maior atenção (MAGALHÃES *et al*, 1986; WEIGLE *et al*, 1996; REITHINGER; DUJARDIN, 2007; ALVES, *et. al.*; 2018).

A forma cutânea localizada é a forma mais prevalente, e no Brasil, essa apresentação clínica é atribuída principalmente à espécie *L. (V) braziliensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; GOTO; LINDOSO, 2012). A LCL é caracterizada pela formação de um nódulo papuloso eritematoso permanecendo de duas semanas até três meses, constituído por um infiltrado dérmico rico em macrófagos, linfócitos e plasmócitos localizado na derme papilar. Com a evolução da infecção, ocorre a formação da úlcera, na maioria das vezes bem característica, redonda ou ovalada, com bordas bem delimitadas e elevadas, base endurecida e fundo limpo, normalmente indolor ou pouco dolorosa, que aparece no local da picada do flebotomíneo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; GOTO; LINDOSO, 2012). A LCL tem tendência à cura espontânea em alguns meses ou mesmo anos e apresenta boa resposta ao tratamento (GOTO; LINDOSO, 2012).

A forma disseminada é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões que acometem diversas regiões do corpo, com maior frequência no tronco e na face (TURETZ, *et. al.*, 2002). A LD é observada em até 2% dos casos de leishmaniose cutânea, sendo predominante no sexo masculino (TURETZ, *et. al.*, 2002; KRUSCHEWSKY; FALQUETO; PEÇANHA, 2021). A provável hipótese para o surgimento de diversas lesões é a disseminação do parasito via hematogênica ou linfática, podendo ocorrer comprometimento mucoso em até 30% dos casos. Com isso, podem ocorrer manifestações sistêmicas como febre, mal-estar geral, dores musculares, emagrecimento, anorexia, entre outros sinais e sintomas. As lesões podem ter características típicas de úlceras presentes na LCL, com o fundo granuloso e bordas elevadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017, GOTO; LINDOSO, 2012,

MENDES, 2013). No entanto, são frequentes entre os pacientes com LD lesões acneiformes, nodulares ou papulares que aparecem rapidamente em grande quantidade, diferentemente dos pacientes com LC com múltiplas lesões, em que as lesões aparecem em diferentes fases da doença. (TURETZ, et. al., 2002). No Brasil, a LD é atribuída à espécie *L. (V) braziliensis*. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017, GOTO; LINDOSO, 2012, MENDES, 2013; KRUSCHEWSKY; FALQUETO; PEÇANHA, 2021).

A LCD constitui uma forma clínica rara e de maior gravidade. O paciente pode apresentar deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*, sendo no Brasil causada principalmente pela *L. (L.) amazonensis*. O desenvolvimento da doença ocorre de forma lenta com a formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994B, MENDES, 2013, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Além das três principais formas clínicas da LC, podem ocorrer casos de *recidiva cutis* e manifestações clínicas atípicas. Na forma *recidiva cutis* ocorre reativação da lesão nas bordas após a cicatrização, mantendo-se o fundo com aspecto cicatricial. A resposta à terapia não costuma ser tão eficaz quanto da lesão primária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; GOTO; LINDOSO, 2012). Nas formas atípicas, os pacientes podem exibir lesões vegetantes verrucosas com a superfície seca e áspera, com presença de crostas e descamação; vegetativas possuindo aspecto papilomatoso, úmido e de consistência mole e outros aspectos, mais raros. Essas lesões podem ser primárias ou evoluírem a partir de úlceras. O surgimento de lesões atípicas pode estar relacionado com cepas variantes de *L. (V.) braziliensis*. Quaresma e colaboradores (2018) demonstraram alterações inter e intraespecíficas no subgênero *Viannia*, contudo, ainda é desconhecida a interação entre as espécies variantes e o hospedeiro vertebrado.

1.3 Aspectos imunopatológicos e biomarcadores associados à leishmaniose cutânea

A forma infectante do gênero *Leishmania* é a promastigota metacíclica. A inoculação dessas formas no hospedeiro vertebrado acontece durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotômio infectadas (CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO, 2018). O

microambiente extracelular é desfavorável à sobrevivência do parasito. Dessa forma, as promastigotas são fagocitadas, transformam-se em amastigotas que apresentam maior resistência e desencadeiam menor resposta oxidativa da célula hospedeira (ALVES, 2014, MEIRA; GEDAMU, 2019), sendo os histiócitos e neutrófilos infiltrados as primeiras células a interagir com o parasito.

A interação *Leishmania*-neutrófilo é fundamental para o estabelecimento da infecção no hospedeiro. No interior dos neutrófilos, o parasito não é capaz de se multiplicar, sugerindo que os neutrófilos sejam um abrigo temporário para o parasito no momento inicial da infecção (ALVES, 2014). Os neutrófilos podem fagocitar, liberar enzimas e proteínas e formar NETs (*neutrophil extracellular traps*) como mecanismos de defesa (CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO, 2018). O rápido recrutamento dessas células para o local da lesão pode ser devido a fatores do hospedeiro e componentes imunomoduladores da saliva do vetor (CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO, 2018), que contém endonuclease, e, dessa maneira, pode digerir as NETs formadas por neutrófilos favorecendo a disseminação local de promastigotas (MEIRA; GEDAMU, 2019).

Na LC causada por *L. braziliensis*, os neutrófilos infectados apresentam perfil inflamatório, produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e secretam altos níveis de quimiocinas e citocinas como: CXCL8, CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4, IL-12 e IFN- γ que atuam no recrutamento de macrófagos e linfócitos T pró-inflamatórios para o local da lesão (CONCEIÇÃO, et. al., 2016; CONCEIÇÃO-SILVA; LEITE-SILVA; MORGADO, 2018). Por outro lado, os macrófagos podem fagocitar neutrófilos apoptóticos que abrigam parasitos viáveis (“Cavalos de Tróia”), condição que permite a entrada silenciosa do parasito, sem ativação do fagócito (MEIRA; GEDAMU, 2019; REGLI, et. al., 2017). Esse processo induz a produção e secreção de citocinas moduladoras, como TGF- β e IL-10 pelos macrófagos, que favorecem o estabelecimento da infecção (VANZANDBERGEN, et. al., 2004; JAMEEL; AL-QADHI, 2020). Os parasitos presentes no fagolisossomo dos macrófagos são resistentes e se multiplicam mesmo em ambiente hostil. Na tentativa de eliminação do parasito, ocorre ativação de mecanismos oxidativos, com produção de radicais hidroxila, superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (NO) que interagem com a membrana fosfolipídica do patógeno levando a morte (ALVES, 2014; REIS; et. al., 2006). No

entanto, a produção exagerada de NO pode contribuir para o dano tecidual, observado principalmente na LM (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVAEZ, 2020). A capacidade do parasito resistir ao NO produzido por macrófagos depende da espécie de *Leishmania* envolvida. Tem sido descrito que *L. braziliensis* apresenta maior índice de infecção e menor capacidade de induzir produção de NO *in vitro* quando comparada à infecção por outras espécies do subgênero *Viannia* (CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO, 2018).

A formação da úlcera é resultado da exacerbada ativação do sistema imunológico e recrutamento de neutrófilos, células NK (*natural killer*) e principalmente monócitos e linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺. A ativação dessas células induz uma resposta inflamatória crônica que contribui para necrose do tecido (MONTROYA, et. al., 2018). As células TCD8⁺ são benéficas contra infecção por *Leishmania* ao estimular produção de IFN- γ . Entretanto, podem ser prejudiciais pela atividade citotóxica (CONCEIÇÃO-SILVA; LEITE-SILVA; MORGADO, 2018; LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVAEZ, 2020).

Nesse sentido, o equilíbrio entre as respostas do tipo 1 e tipo 2 é determinante para o desenvolvimento da doença, podendo evoluir para formas mais graves ou autolimitadas (CONCEIÇÃO-SILVA; LEITE-SILVA; MORGADO, 2018). A resposta do tipo 2 presente no momento inicial da infecção, é responsável pelo estabelecimento da doença, caracterizada pela produção de IL-4, IL-10 (JAMEEL; AL-QADHI, 2020) IL-13, TGF- β e regulação negativa de iNOS que favorece a proliferação intracelular dos parasitos (COUTINHO, et al, 1998; BRELAZ, et. al., 2012A; BRELAZ, et. al., 2012B; MEIRA; GEDAMU, 2019; CONCEIÇÃO-SILVA; LEITE-SILVA; MORGADO, 2018).

Pirmez e colaboradores (1993) sugerem que o curso clínico da infecção por *L. braziliensis* no homem estaria associado ao padrão local da produção de citocinas. Assim, se após o estabelecimento da infecção for observado predomínio de citocinas do tipo 1, como TNF e IL-12, produzidas por macrófagos e, conseqüentemente, diferenciação de células Th1 e produção de IFN- γ , poderá haver controle do parasitismo e resolução da infecção (MENDES, 2013; PIRES, et. al., 2012; JAMEEL; AL-QADHI, 2020)

Por outro lado, a presença de citocinas do tipo 1 e 2 com predomínio de IL-4 e IL-10 com o tempo de evolução das lesões, pode estar associado a formas graves da doença (SCHRIEFER, et. al., 2008; CASTELLANO, et. al., 2009). Estudos que mostram redução de IL-10 e IL-4 após a cura clínica de lesões de LCL, reforçam a hipótese de que essas citocinas estão envolvidas na proliferação do parasito e exacerbação da doença (SCHRIEFER; et. al., 2008; CASTELLANO, et. al., 2009). No entanto, é importante ressaltar que a resposta tipo 1 exacerbada tem sido associada a maior dano tecidual, como observado na LM (PIRES, et. al., 2012; BRELAZ, et. al., 2012A; BRELAZ, et. al., 2012B; ALVES, et. al., 2018; BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018; HIPPIÓLITO, 2019). Esses dados deixam clara a necessidade do equilíbrio entre as respostas do tipo 1 e tipo 2. Estudos que avaliam a expressão gênica de citocinas e quimiocinas em biópsias de lesões cutâneas têm mostrado maior expressão de IL10, IL4, TNF, IFN- γ , IL12, CCL2, CCL3, CCL5 e CXCL10 em lesões recentes do que em lesões tardias, sugerindo a associação desses biomarcadores com a evolução da lesão e resolução da doença (COSTA-SILVA, et. al., 2014).

Em lesões com mais de 6 meses de evolução ocorre diminuição gradual das células TCD8⁺ e aumento de células TCD4⁺ que está relacionado ao início da cicatrização. Ocorre também acúmulo de células Treg, produtoras de IL-10 e TGF- β , e a presença de células Th17, que contribuem para o equilíbrio do microambiente inflamatório, modulando a imunidade adaptativa (CONCEIÇÃO-SILVA; LEITE-SILVA; MORGADO, 2018; MEIRA; GEDAMU, 2019; BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018).

A cicatrização de feridas é um processo complexo que envolve o processo inflamatório, a formação de tecido de granulação e remodelagem tecidual (BARRIENTOS, et. al., 2008; KIWANUKA, JUNKER, ERIKSSON, 2012). Após o dano tecidual, o processo de reepitelização é iniciado com a liberação de fator crescimento fibroblastos (FGF) que estimula a proliferação de células endoteliais. Com isso, ocorre a produção de um novo colágeno, e o colágeno antigo é destruído por estímulo de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). O resultado desse processo é a cicatriz (BARRIENTOS, et. al., 2008).

Acredita-se que diferentes fatores de crescimento tenham papéis na cicatrização de feridas, incluindo migração e proliferação de queratinócitos e fibroblastos. fator

estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é um dos marcadores mais estudados, estando relacionado com ativação de neutrófilos e monócitos/macrófagos migração de células epiteliais, proliferação de queratinócitos, na modulação do fenótipo de fibroblastos e aumento dos níveis de VEGF (CRUCIANI, 2005; KIWANUKA, JUNKER, ERIKSSON; 2012).

Em um estudo duplo-cego realizado com administração intralesional de GM-CSF em úlceras venosas crônicas foi descrita melhora significativa da taxa de cura em aproximadamente 60% dos casos em um mês (COSTA, et. al., 1999). Também foi demonstrado que a administração de estibogluconato de sódio juntamente com GM-CSF aumentou a taxa de cura e reduziu o tempo de cicatrização em infecções por *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (ALMEIDA, et. al., 1999; SANTOS, et. al., 2004). Outros estudos clínicos avaliaram o uso de um ou vários fatores de crescimento, como PDGF, EGF e FGF para o tratamento de úlceras crônicas, apresentando bons resultados quando utilizados individualmente, mas com melhores resultados quando utilizados em combinação (ROBSON, 1991; MAST, SCHULTZ, 1996). O FGF, por exemplo, pode estimular a proliferação e migração de queratinócitos e aumentar a transcrição de fatores envolvidos na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ajudando a reduzir o processo de apoptose (RAJA, et. al., 2007; BARRIENTOS, et. al., 2008).

1.4 Diagnóstico da leishmaniose cutânea

O diagnóstico inicial da LC é baseado em aspectos clínicos e epidemiológicos, no entanto, necessitam de confirmação com testes laboratoriais (ARONSON; JOYA, 2019). São descritos diversos métodos para diagnóstico, com resultados diferentes de precisão, sensibilidade e especificidade. Entretanto, a seleção para o diagnóstico muitas vezes é dependente da infraestrutura e de recursos disponíveis (VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). O diagnóstico clínico-epidemiológico é feito durante a avaliação médica, levando em consideração informações epidemiológicas, tais como existência de casos na região, viagens para áreas endêmicas, referência de roedores ou outros mamíferos em áreas próximas, inserção em áreas florestais, além de aspectos clínicos, como presença de lesão sugestiva (ALVES, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Para o diagnóstico laboratorial, o teste de primeira escolha é o exame direto por meio da visualização de formas amastigotas do parasito, redondas ou ovais, apresentando núcleo e cinetoplasto bem definidos (VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; HANDLER, et. al; 2015), em lâmina confeccionada por meio de esfregaço de biópsia (*imprint*) ou escarificação da borda da lesão, corada por Giemsa. Essas são técnicas de rápida execução e baixo custo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). O uso da escarificação da borda da lesão dispensa a necessidade de profissional médico para realização da coleta do material (biópsia), é importante nos casos em que é necessário um mínimo de manipulação e facilita a coleta de grande número de amostras em um curto espaço de tempo em condições de campo (GARCIA, et. al., 2007).

A análise histopatológica é muito importante para o diagnóstico diferencial, sendo realizada por meio de cortes histológicos dos fragmentos de biópsia corados por Hematoxilina-Eosina (HE). Para diagnóstico de LC, a técnica possui sensibilidade de 30 a 70%, dependendo do padrão e tempo de lesão (COSTA-SILVA, et. al., 2014; ALVES, 2014).

Outra possibilidade de exame parasitológico é a inoculação do fragmento de biópsias em meio de cultura *Novy-MacNeal-Nicolle* (NNN) e *Liver Infusion Triptose* (LIT) para isolamento dos parasitos. A sensibilidade da cultura tende a ser variável, por se tratar de uma técnica propensa a contaminação, é demorada e requer vasta experiência técnica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). O cultivo de aspirado de lesão cutânea constitui uma metodologia alternativa à cultura de fragmento de biópsia (LUZ, et. al., 2009). É feita por meio da aspiração de tecido da borda elevada da úlcera com auxílio de sistema de coleta de sangue (Vacutainer®). O crescimento de *Leishmania* é evidenciado em meio de cultura, apresentando menor risco de contaminações (HANDLER, et. al., 2015). Na LC a frequência em que os parasitos são encontrados é de 63,4% dos casos, sendo que quanto maior o tempo de evolução da doença, menor a frequência de parasitos (MAGALHÃES, 1986).

Os testes imunológicos baseados em pesquisa de anticorpos circulantes como a reação de imunofluorescência indireta, o Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (ELISA), western blot, ensaio de fluxo lateral e teste de aglutinação direta não são usuais para o diagnóstico da LC, pois o número de anticorpos circulantes tende a ser

baixo. Os ensaios imunológicos possuem baixa sensibilidade e especificidade variável, uma vez que pode ocorrer reação cruzada em áreas onde há presença de *Trypanosoma cruzi*, por exemplo, e outras espécies de parasitos da família *Trypanosomatidae* (REITHINGER; DUJARDIN, 2007; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

A intradermoreação de Montenegro (IDRM) é um diagnóstico imunológico de hipersensibilidade tardia que avalia a resposta imune celular por meio de enduração da pele 48 a 72 horas após a inoculação de antígeno (BRAZ, 2019; GOTO; LINDOSO, 2012). A técnica possui boa sensibilidade e especificidade, sendo suficiente para confirmação diagnóstica, caso o paciente não tenha tido leishmaniose anteriormente (MONTENEGRO, 1926). O resultado do teste é influenciado pelo estado imunológico do indivíduo, tempo de evolução da lesão, espécie de *Leishmania* infectante e pelo antígeno empregado (REITHINGER; DUJARDIN, 2007). Em populações de áreas endêmicas, a positividade varia entre 20% a 30% em indivíduos que não apresentam lesão. Após a cura clínica, a IDRM pode permanecer positiva durante anos, limitando-se para diagnosticar casos de reativação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Contudo, a IDRM não é mais usual pois a produção do antígeno pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) do Paraná foi suspensa em 2017 por uma demanda de infraestrutura da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Outra abordagem diagnóstica empregada é a molecular. O diagnóstico é feito por meio da amplificação do DNA do parasito presente em amostras de biópsia utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A PCR é um método molecular amplamente utilizado para fins de pesquisa no diagnóstico da leishmaniose por apresentar alta sensibilidade ao utilizar alvos gênero-específicos ou espécie-específicos, facilitando o diagnóstico em casos de baixo parasitismo, o que representa grande vantagem em relação à microscopia ou cultivo do parasito (REITHINGER; DUJARDIN, 2007). Entretanto, não é amplamente usada na rotina laboratorial devido ao custo elevado em comparação aos métodos parasitológicos de diagnóstico e a necessidade de infraestrutura laboratorial especializada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; RAMALHO, 2018; ALVES, 2014). Diversos alvos moleculares têm sido usados nesses ensaios desde amplificação das sequências do DNA ribossomal

até sequências do cinetoplasto, além disso, outras variedades de PCR estão disponíveis para diagnóstico da LC (VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

A PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) emprega marcadores fluorescentes como o corante SYBR-green ou hibridização com sondas fluorescentes (TaqMan) para monitoramento contínuo da amplificação, ou seja, do produto de PCR formado por meio da reação. A técnica possui uma elevada especificidade, com curto tempo de execução e possui menor risco de contaminação (WORTMANN, et. al., 2005; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). Dentre as vantagens do emprego de técnicas moleculares destacam-se os métodos de coletas não invasivos com uso de *swab*, além de serem eficientes em lesões antigas em que o número de parasitos é reduzido devido à sua elevada sensibilidade. No entanto é mais usual na pesquisa (ADAMS, et. al., 2014; AKHOUNDI, et. al., 2017).

1.5 Tratamento da LT

O tratamento mais usado para LT emprega um derivado do antimônio pentavalente, sendo o antimoníato de meglumina (N-metil Glucamina), conhecido comercialmente como Glucantime[®] usado no Brasil. O Glucantime[®] pode ser usado para o tratamento de todas as formas clínicas da LT. A forma localizada, normalmente, apresenta boa resposta ao tratamento, cuja taxa de cura está entre 71,3 e 91,4% (TUON, et. al., 2008; PEREZ-FRANCO, et. al., 2016; ALVES, et. al., 2018), já a forma disseminada apresenta resposta variável, sendo que a maioria dos pacientes necessitam de tratamento com doses adicionais para alcançar a cura clínica devido a taxa de recidiva. No entanto, na forma difusa, os pacientes geralmente não apresentam boa resposta ao tratamento, sendo atribuída melhores respostas com isetionato de pentamidina, e na forma mucosa o tratamento pode ser prolongado por apresentar resposta lenta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Além do Glucantime[®], o Sistema Único de Saúde (SUS) dispõe de mais três alternativas para tratamento da LT. Desoxicolato de Anfotericina B, Anfotericina B Lipossomal e recentemente implantada a miltefosina. O Desoxicolato de Anfotericina B é indicado para as formas clínicas cutânea e mucosa para os casos em que houve insucesso com o uso do Glucantime[®]. Já a anfotericina B Lipossomal pode ser

administrada em pacientes que apresentam comorbidades que impeçam o uso do Glucantime® (MINISTERIO DA SAÚDE, 2021).

A miltefosina foi inicialmente desenvolvida e usada para o tratamento de câncer, entretanto estudos demonstraram efetividade em algumas espécies de *Leishmania* (MACHADO-PAULO; PENNA-GERSON, 2021). Estudos demonstram que a miltefosina apresenta taxas de cura semelhantes em comparação ao Antimoniato de Meglumina, com menor taxa de eventos adversos (MINISTERIO DA SAÚDE, 2016). Considerando esses resultados, em 2021 o Ministério da Saúde emitiu uma nota informativa com orientações sobre a miltefosina, nome comercial Miltex® e Impavido®, como primeira linha para o tratamento da LT no SUS. Este tratamento foi disponibilizado a partir de março de 2021 para uso oral, sendo o protocolo de tratamento realizado em duas etapas de 14 dias cada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

1.6 Tratamento da LT com Antimoniato de meglumina (Glucantime®)

O Glucantime® é a droga de primeira escolha para o tratamento da LT no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Os mecanismos de ação dos antimoniais não são totalmente compreendidos (VARGAS, et. al., 2019). É descrito que os antimoniais pentavalentes têm ação leishmanicida interferindo na β -oxidação de ácidos graxos e glicólise das *Leishmanias*, levando à diminuição dos níveis de ATP intracelular. Na forma amastigota de *Leishmania* são encontradas metaloproteases zinco dependente essenciais para a sobrevivência do parasito. O antimônio pode substituir o zinco, levando à redução e controle do parasitismo (WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004, RATH, et. al., 2003). No entanto, ainda não é bem descrito como essa droga inibe a oxidação de ácidos graxos (VARGAS, et. al., 2019).

O antimonial pentavalente é considerado uma pro-droga que quando administrado é convertido a antimônio trivalente Sb^(III), forma mais ativa da droga (SINGH, et. al., 2006). No Brasil o Glucantime® é comercializado em frascos de 5ml que possui 1,5g do antimoniato bruto, correspondendo a 405mg do antimonial pentavalente (Sb⁺⁵) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A administração pode ser feita via intramuscular ou endovenosa em dose de 20mg/kg/dia durante 20 dias consecutivos. O uso do

Glucantime® não deve ultrapassar noventa dias e o paciente deve ser monitorado até doze meses após o tratamento. A eficácia terapêutica pode ser verificada entre 3 e 6 meses após o início do tratamento. Caso a lesão não tenha cicatrizado neste período, o tratamento pode ser prolongado por mais um mês (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

É considerado critério para cura apenas os aspectos clínicos, uma vez que não é observada a cura parasitológica (ALVES, et. al., 2018; SILVA, et. al., 2019, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Durante o processo de cura é observado o desaparecimento de crostas, descamação da lesão, redução da infiltração e desaparecimento do eritema, caracterizando o processo de cicatrização (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Em casos de pacientes que não respondem ao tratamento convencional ou em que o Glucantime® for contraindicado, são utilizadas drogas de segunda escolha, como Anfotericina B lipossomal ou Pentamidina. Considerando a toxicidade cardíaca, hepática e renal, o tratamento com Glucantime® é contraindicado para pacientes com idade acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias, hipersensibilidade ao composto e em grávidas, pois há evidências de que o antimoniato pode atravessar a barreira transplacentária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Em 2010 a WHO recomendou o tratamento tópico como alternativa nas Américas (Novo Mundo) e em 2013 a *Pan American Health Organization Expert Committee on Leishmaniasis* implementou o tratamento intralesional (ALVES, 2014; SILVA, et. al., 2016). A vantagem da terapia intralesional comparada à sistêmica, não está relacionada somente a efeitos locais, mas ao uso de doses baixas de antimônio, que em consequência, resulta em menor toxicidade sistêmica (SILVA, et. al., 2016). A eficácia descrita do tratamento intralesional varia no Velho Mundo com 75,1% e no Novo Mundo com 76,9%, taxas de cura semelhantes ao descrito para tratamento sistêmico (BRITO; RABELLO; COTA, 2017).

Estudos recentes também demonstram a eficácia e segurança do emprego da terapia intralesional. O trabalho de Silva e colaboradores (2016) evidencia que o tratamento intralesional é promissor. Foram eleitos para realizar o tratamento intralesional

pacientes que apresentavam uma ou mais contraindicações para o tratamento sistêmico, pacientes que tiveram cura parcial ao tratamento sistêmico, pacientes que tiveram reações graves ao tratamento sistêmico e pacientes que optaram pelo tratamento intralesional. A taxa de cura após seis meses foi de 77,7%, ou seja, do total de 27 pacientes incluídos no estudo, 21 foram curados com a terapia intralesional de Glucantime®.

Em estudos que avaliaram o perfil de segurança da terapia intralesional, observou-se que os efeitos adversos são predominantemente de intensidade leve a moderada no local da infiltração com 83% dos pacientes com efeitos locais como presença de prurido, edema ou dor. Alterações laboratoriais ocorreram em 32% dos casos e alterações eletrocardiográficas em 64,1% dos pacientes. Isso sugere que o principal fator determinante para a segurança da terapia é do uso de menores doses, não da via de administração (FERNANDES, 2019).

Apesar da terapia intralesional ser uma alternativa para o tratamento da LCL, a técnica ainda não era padronizada e validada. A padronização e validação da técnica foi desenvolvida no Centro de Referência em Leishmanioses (CRL) do Instituto René Rachou (IRR) (SILVA et. al 2019). A elaboração de um procedimento operacional padrão (POP) foi proposto e validado com base na teoria psicométrica para execução da técnica e adotado pelo Ministério da Saúde (MS).

Segundo recomendações do MS (2017) e com base no POP proposto e validado pelo CRL-IRR a terapia intralesional é restrita para a forma clínica cutânea localizada causada por *L. braziliensis* ou outras espécies (exceto *L. guyanensis*), com lesão única de até três centímetros em qualquer região do corpo, exceto na cabeça e regiões periarticulares de indivíduos sem imunossupressão. O tratamento também pode ser administrado em casos de leishmaniose *recidiva cutis*. A terapia intralesional consiste na administração subcutânea que varia de uma a três aplicações de aproximadamente 5 mL de Glucantime® na lesão. Após 15 dias da primeira aplicação, se não for observado reepitelização, é realizada uma segunda aplicação. Se ainda não for evidenciado reepitelização da lesão, é feita uma terceira aplicação após 30 dias da segunda. Sendo assim, o progresso da lesão é monitorado por até 120 dias. Em caso de insucesso na cicatrização em três meses, o protocolo pode ser iniciado novamente.

Os efeitos adversos são equivalentes ao tratamento sistêmico, porém, em grau leve a moderado, podendo ser revertido após o término do tratamento.

2. Justificativa

A leishmaniose é uma das 17 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN), e é endêmica em países tropicais e subtropicais que possuem acesso limitado à saúde e em que parte da população tem contato próximo com vetores e reservatórios. Dados apontam que mais de 1 bilhão de pessoas residem em áreas endêmicas para leishmaniose e correm risco de infecção. Estima-se que 30.000 novos casos de LT ocorram anualmente (WHO, 2022). Desse total, 16.432 foram registrados somente no Brasil (OPAS, 2021), sendo o estado de Minas Gerais, o terceiro com maior número de casos de LT no país, perdendo apenas para os Estados Pará e Mato Grosso (Sinan/SVS/MS, 2022).

A LT está relacionada a uma morbidade significativa, entretanto, a letalidade relacionada à doença não é esperada. Embora não seja letal, a LT pode levar a deformidades que podem afetar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Nesse sentido, o diagnóstico e tratamento adequados e oportunos, representam ações fundamentais para o bem estar dos pacientes. O tratamento para LT disponível no Brasil como primeira escolha é o Antimoniato de Meglumina, comercialmente conhecido como Glucantime[®]. Essa droga administrada de forma endovenosa pode causar forte toxicidade, exigindo rigoroso monitoramento dos pacientes, além de ser contraindicada em vários casos.

Considerando as limitações do uso de Glucantime[®] endovenoso, especificamente para casos de LCL, recentemente, o Ministério da Saúde (2017), incorporou o uso do Glucantime[®] intralesional como uma das modalidades de tratamento para LCL. A eficácia e segurança desse tratamento têm sido tema de diversos estudos (SILVA, et. al., 2016; RAMALHO, et. al., 2018; FERNANDES, et. al., 2020), onde foi observada toxicidade de leve a moderada com efeitos adversos predominantemente locais.

Além dos aspectos de eficácia e segurança, é sabido que para o tratamento efetivo da infecção é importante que o paciente apresente um perfil de resposta imune favorável ao controle do parasitismo e que em associação ao medicamento usado, poderá promover a resolução da doença. Diante disso, vários estudos têm abordado

esses aspectos ao longo de décadas. No entanto, o entendimento dos processos imunológicos locais e sistêmicos associados à infecção na LCL permanece como necessidade fundamental e constante, considerando as novas descobertas e alternativas de tratamento e vias de administração dos fármacos, propostas na atualidade.

Conhecer o perfil de biomarcadores imunológicos pode contribuir para a compreensão da complexa rede de interações que ocorrem em nível sistêmico e principalmente no local da lesão na LCL e que pode indicar resposta ao tratamento. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil de resposta imune apresentado pelos pacientes que atenderam aos critérios e recomendações do MS para realizar a terapia intralesional e verificar diferenças e semelhanças nesse perfil de biomarcadores imunológicos apresentado por este grupo em relação aos pacientes que trataram com Glucantime[®] endovenoso. Os achados desse estudo, além de trazerem o conhecimento acerca do padrão de resposta imune apresentado por pacientes com lesão única, bem característica, de tamanho e localização específicas, poderão reforçar a necessidade desses critérios preconizados pelo MS para uso da terapia intralesional.

3. Objetivo

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de resposta imune circulante e no local da lesão dos mediadores solúveis (quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento celular) de pacientes com leishmaniose cutânea localizada antes do início do tratamento com Glucantime® intralesional ou endovenosa que tiveram desfecho de cura clínica.

3.2 Objetivos Específicos

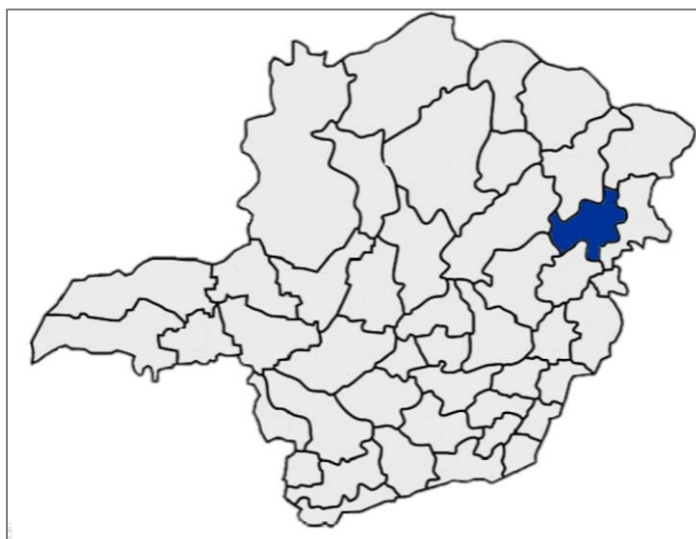
- Avaliar o perfil de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento em amostras de plasma e exsudato inflamatório de pacientes com leishmaniose cutânea localizada antes do início do tratamento com Glucantime® endovenoso;
- Avaliar o perfil de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento em amostras de plasma e exsudato inflamatório de pacientes com leishmaniose cutânea localizada antes do tratamento com Glucantime® intralesional;
- Associar o perfil imunológico de pacientes submetidos a terapia com Glucantime® intralesional e endovenoso;
- Avaliar o perfil de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento em amostras de plasma e exsudato inflamatório de pacientes com leishmaniose cutânea localizada tratados com Glucantime® intralesional, considerando o tempo de evolução das lesões cutâneas;
- Associar o perfil imunológico de pacientes submetidos a terapia com Glucantime® intralesional, considerando o tempo de evolução das lesões cutâneas.

4. Materiais e métodos

4.1 Área de estudo

O município de Teófilo Otoni (Figura 1) é a cidade polo da macrorregião Nordeste de Minas Gerais, uma das regiões mais pobres do país, em que tem sido observada crescente destruição das reservas naturais, o que contribui para a ocorrência de doenças zoonóticas. Nesse sentido, o município vem apresentando registros crescentes de casos de LT nos últimos anos e recebendo cada vez mais casos da região. De acordo com dados do SINAN-NET, entre 2018-2022 foram registrados 349 casos de LT, com média anual de 128 casos, na região.

Figura 1: Localização geográfica do município de Teófilo Otoni.



Mapa das microrregiões do estado de Minas Gerais destacando a localização geográfica do município de Teófilo Otoni, Minas Gerais, Brasil. FONTE: DINIZ; BATELLA, 2005 modificado.

4.2 Aspectos éticos

A participação no estudo foi condicionada à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1) pelos participantes, estando em concordância com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, que regulamenta a pesquisa em seres humanos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (CAAE 78052017.1.0000.5091; número: 2.401.147- 2017).

4.3 Caracterização da população avaliada

Para este estudo foi utilizada “amostra de conveniência”, que se define pela disponibilidade de amostras e de exequibilidade do estudo. O grupo controle sem lesão cutânea (SL) foi composto por oito voluntários de ambos os sexos, com idade entre 25 e 41 anos residentes na região metropolitana de Belo Horizonte. Os atendimentos dos casos de lesões suspeitas de leishmanioses cutânea foram realizados no ambulatório de referência em leishmanioses da Policlínica Municipal Dr. Roberto Shuffner de Teófilo Otoni, incluindo indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 18 e 90 anos. Todas as coletas foram realizadas antes do início do tratamento. Os pacientes diagnosticados com LCL foram acompanhados durante seis meses após o tratamento para avaliação do processo de reepitelização e total cicatrização da lesão.

O diagnóstico clínico/epidemiológico (Anexo 2) e laboratorial foi realizado para LCL (parasitológico e/ou molecular). Os casos positivos foram agrupados de acordo com o tratamento administrado, sendo: grupo LC-EV (n=10), pacientes tratados via endovenoso com Glucantime®; grupo LC-IL (n=25), pacientes tratados com Glucantime® intralesional.

A seleção clínica de cada grupo foi realizada seguindo os critérios e recomendações preconizadas pelo MS para o tratamento com Glucantime®. O tratamento endovenoso foi administrado nos casos de múltiplas lesões (≤ 20 lesões), localizadas em qualquer região do corpo e com diâmetro superior a três centímetros. E o grupo tratado com Glucantime® intralesional foi composto por pacientes que apresentaram lesão típica, única, localizada em membros ou tronco, e com até três centímetros de diâmetro. Os pacientes que apresentaram lesão clinicamente típica de leishmaniose, porém com diagnóstico parasitológico e molecular negativo para LCL, foram submetidos ao diagnóstico histopatológico diferencial. Esse grupo foi composto por 14 pacientes, aqui denominados como pacientes com lesão não leishmaniótica (NL). A análise histopatológica indicou dermatite crônica ou vasculite. A Tabela 1 abaixo mostra as principais características de cada grupo estudado. O Apêndice 2 mostra as principais características demográficas da população de estudo.

Tabela 1 – Características dos grupos do estudo

	SL	NL	LC-EV	LC-IL
Participantes (n)	8	14	10	25
<u>Sexo</u>				
Masculino (%)	4 (50)	7 (50)	5 (50)	13 (52)
Feminino (%)	4 (50)	7 (50)	5 (50)	12 (48)
Idade (mediana)	27,5	66,5	54	47
Mínimo-máximo	26-41	31 - 84	18-84	18 - 78
<u>Localização da lesão (%)</u>				
Membros superiores	N/A	1 (7,2)	2 (20)	11 (44)
Membros inferiores	N/A	13 (92,8)	8 (80)	12 (48)*
Aspecto da lesão	N/A	Ulcerada	Ulcerada	Ulcerada
Tempo de lesão (meses)	N/A	1-12	1-4	1-12
Tamanho da lesão (mediana - mm ²)	N/A	314	210	208
Número de lesões	N/A	1-2	>3	1

SL – Controle sem lesão cutânea

NL – Pacientes com diagnóstico negativo para leishmaniose

LC-EV – Pacientes com leishmaniose tratados com Glucantime[®] endovenoso

LC-IL - Pacientes com leishmaniose tratados com Glucantime[®] intralesional

N/A – Não se aplica

*Dois pacientes do grupo LC-IL apresentaram lesões no tronco

FONTE: O autor

Posteriormente, para análise do perfil imunológico considerando o de tempo de lesão, o grupo LC-IL foi categorizado em: grupo lesão recente (IL-LR), com lesões de até 2 meses de evolução (n=12) e grupo lesão tardia (IL-LT), com lesões com mais de dois meses de evolução (n=13). A categorização de tempo de lesão seguiu a classificação utilizada por Carvalho e colaboradores (1985).

4.3.1 Critérios de inclusão e exclusão para indivíduos do grupo controle sem lesão cutânea (SL)

Foram convidados a participar do estudo indivíduos saudáveis, sem história prévia de LT e LV. Não foram incluídos no estudo indivíduos que desenvolveram lesões cutâneas ou mucosas durante o período avaliado e indivíduos com doenças sistêmicas concomitantes, que sabidamente interferem com a capacidade imunológica do indivíduo.

4.3.2 Critérios de inclusão e exclusão para indivíduos com lesão não leishmaniótica (NL)

Foram convidados a participar do estudo indivíduos sem história prévia de LT e LV que apresentaram lesões cutâneas sugestivas de leishmaniose, porém com diagnóstico parasitológico e/ou molecular negativo. Não foram incluídos no estudo pacientes em tratamento prévio com drogas leishmanicidas; pacientes gestantes ou lactantes e pacientes com doenças sistêmicas concomitantes, que sabidamente interferem com a capacidade imunológica do indivíduo.

4.3.3 Critérios de inclusão e exclusão para pacientes com LCL (LC-EV e LC-IL)

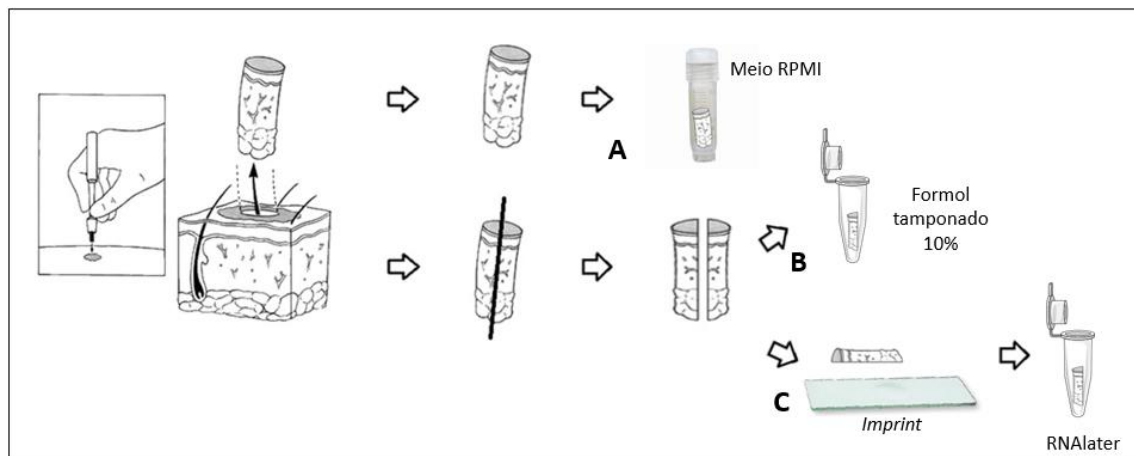
Foram convidados a participar do estudo pacientes com quadro clínico compatível com LCL que tiveram confirmação diagnóstica por teste parasitológico e/ou molecular. Não foram incluídos no estudo pacientes que apresentaram comprometimento mucoso e pacientes sem confirmação da infecção por *Leishmania* por exame parasitológico ou molecular; pacientes em tratamento prévio com drogas leishmanicidas; pacientes gestantes ou lactantes e pacientes com doenças sistêmicas concomitantes, que sabidamente interferem com a capacidade imunológica do indivíduo.

4.4 Coleta e destinação das amostras

Dois fragmentos de biópsia da borda da lesão cutânea foram coletados utilizando *punch* estéril de 5,0 mm de diâmetro. O excesso de sangue foi retirado em papel filtro e um dos fragmentos foi armazenado em meio Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI) suplementado (10% soro fetal bovino, 3% penicilina/streptomina e 1% heparina sódica), para avaliação do perfil de biomarcadores presentes no exsudato inflamatório por meio do ensaio Luminex. O segundo fragmento foi dividido em duas partes no sentido longitudinal com auxílio de um bisturi. Uma das partes foi pressionada contra lâmina de microscopia para realização do exame parasitológico direto (*Imprint*) e, em seguida, o fragmento foi armazenado em RNA*later* para diagnóstico molecular, caso o diagnóstico parasitológico fosse negativo. A outra metade do fragmento foi armazenada em formol tamponado 10% para realização de

diagnóstico diferencial por análise histopatológica dos casos negativos para LCL (Figura 2). Foi coletado também 10 mL de sangue periférico em tubo contendo heparina sódica para obtenção do plasma e realização do ensaio Luminex.

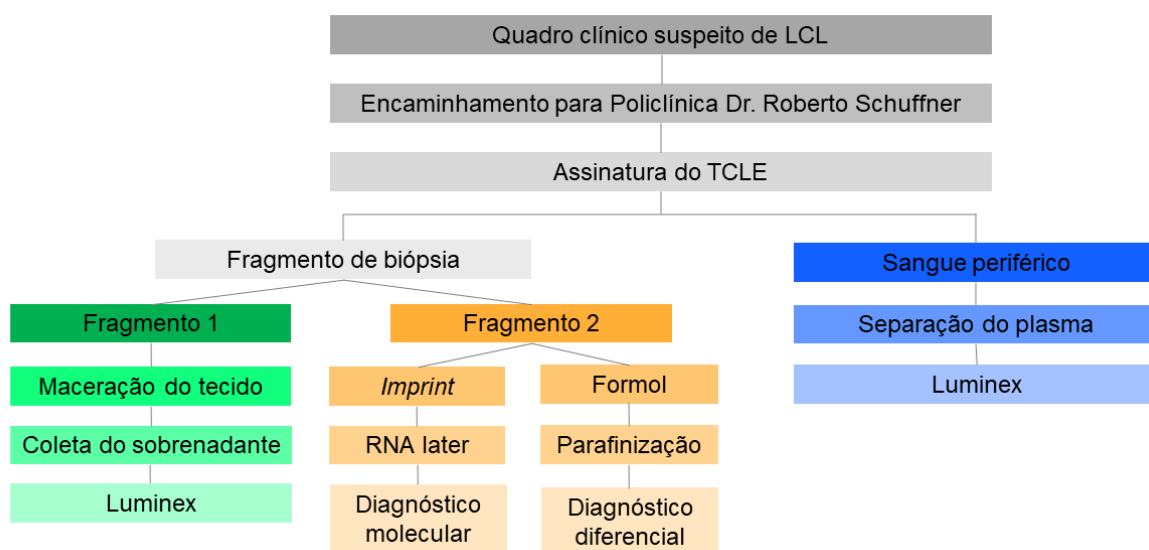
Figura 2: Procedimento de coleta e armazenamento do fragmento de biópsia.



A – Coleta do fragmento de biópsia e armazenamento em meio RPMI suplementado para maceração e coleta do exsudato inflamatório. **B** – Coleta do fragmento de biópsia e armazenamento em formol tamponado 10% para análise histopatológica. **C** – *Imprint* em lâmina e armazenamento do fragmento em meio RNAlater para realização da PCR para diagnóstico. FONTE: Própria autoria.

Na figura 3 apresentamos o fluxograma resumido do desenho do estudo.

Figura 3: Fluxograma representativo do desenho do estudo.



FONTE: O autor.

4.5 Diagnóstico dos casos suspeitos para LCL

O diagnóstico foi feito preferencialmente por meio da técnica de *imprint* que consiste em pressionar o fragmento de biópsia contra uma lâmina de microscopia para visualização de formas amastigotas. Foram feitos oito *imprints* na mesma lâmina de cada paciente. O *imprint* foi fixado com metanol e as lâminas foram coradas usando Giemsa para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* (Apêndice 1A).

Na impossibilidade de confirmação do diagnóstico por *imprint*, foi utilizado o método molecular. O fragmento de biópsia coletado em RNAlater foi submetido à extração de material genético (DNA) utilizando o kit PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) e amplificado por PCR convencional. O alvo utilizado foi a região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania* utilizando os iniciadores A: 5' (C/G)(C/G)(G/C)CC(C/A)CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' e B: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3', gerando um fragmento de 120pb (DEGRAVE, et. al., 1994). Os produtos amplificados na PCR foram visualizados em exposição à luz ultravioleta (UV) após a eletroforese em gel de agarose (2.0%) corado com brometo de etídeo. A visualização do resultado foi realizada empregando o Transilluminador L Pix – Loccus Biotecnologia (Apêndice 1B).

4.6 Diagnóstico diferencial por histopatologia

A análise histopatológica foi realizada para diagnóstico diferencial dos casos negativos para LCL. Os fragmentos de biópsias foram coletados e acondicionados em formol tamponado (pH 7,2) a 10% para interromper o processo de autólise das células. O processamento das biópsias foi feito em processador de tecidos automático, seguindo as etapas de desidratação, clarificação e inclusão de parafina. Os cortes histológicos foram feitos com auxílio do micrótomo para obtenção de cortes de 5 µm de espessura que foram acomodados em lâminas de vidro para coloração com hematoxilina e eosina (HE).

Na microscopia foram observados os seguintes parâmetros: identificação dos tipos celulares, características e classificação do infiltrado inflamatório, conforme descrito por de Magalhães e colaboradores (1986) e avaliação da presença de outros

patógenos e células tumorais. Esta análise foi coordenada pelo médico anátomo-patologista e infectologista Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier da Universidade Federal de Minas Gerais e Grupo de Imunologia de Doenças Virais do IRR-Fiocruz/Minas. Dos diagnósticos negativos para LCL foram identificados principalmente dermatite crônica e úlceras vasculares.

4.7 Avaliação do perfil de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento presentes no plasma e no exsudato inflamatório

Os fragmentos de biópsia foram coletados em meio RPMI suplementado, armazenados sob refrigeração e processados em até 48 horas. O fragmento de biópsia foi macerado em placa de petri com auxílio do bisturi e o exsudato inflamatório foi recolhido e armazenado em microtubo a -80°C para posterior utilização no ensaio Luminex. As amostras de sangue periférico coletadas em tubo contendo anticoagulante heparina sódica, foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm a 20°C para separação do plasma. O plasma foi separado e armazenado a -80°C até o momento do ensaio. Os níveis de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento foram quantificados utilizando o kit Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex – Biorad que permite a avaliação simultânea de 27 analitos, sendo: quimiocinas CXCL8, CCL4, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10, citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-15, IL17A, citocinas moduladoras IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 e fatores de crescimento FGF, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-7, por meio do emprego de microesferas magnéticas (*beads* magnéticas) de diferentes intensidades de fluorescência recobertas com anticorpos específicos para cada biomarcador.

Inicialmente, as amostras de exsudato inflamatório e plasma foram descongeladas em banho-maria a 37°C , homogeneizadas em vórtex por 5 segundos e centrifugados a $14.000 \times g$, por 5 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram filtradas em filtro de $0,20 \mu\text{m}$ com auxílio de seringa de 1 mL. As placas de fundo chato para o ensaio Luminex (Bio-Plex Pro Microplate Wash Station) (Bio-Rad – CA, EUA) foram preparadas com adição de $50 \mu\text{L}$ da mistura de *beads* magnéticas conjugadas com anticorpos monoclonais anti-biomarcadores presentes no kit (diluídas 10x em tampão de diluição *Assay Buffer*). O padrão foi reconstituído com $250 \mu\text{L}$ do reagente *Standard Diluent* e foram feitas oito diluições seriadas para construção da curva padrão. Em

seguida, 50 μ L dos padrões das *beads* foram adicionados aos poços correspondentes à curva padrão, que foi realizada em duplicata para cada um dos 8 pontos da curva. Também foram adicionados 50 μ L de cada amostra aos poços correspondentes na placa. Na sequência as placas foram lavadas duas vezes com 100 μ L de *Wash Buffer* diluído 10x com água tipo I e incubadas *overnight* a 4°C sob agitação constante a 500 rpm e ao abrigo da luz.

No dia seguinte, as placas foram lavadas com 200 μ L *Wash Buffer*, 25 μ L do anticorpo de detecção previamente diluído 10x com *Antibody Diluent* foi adicionado em cada poço e as placas incubadas por 30 minutos sob agitação a 500 rpm, temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Na sequência, as placas foram lavadas três vezes com 100 μ L de *Wash Buffer* e a cada poço foi adicionado como agente revelador, 50 μ L de estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) diluído 100x com tampão de ensaio. As placas foram incubadas por 30 minutos sob agitação a 500 rpm, temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As placas foram lavadas novamente com 100 μ L *Wash Buffer* e os *pellets* foram ressuspendidos com 125 μ L de tampão de ensaio. As amostras foram homogeneizadas por 10 minutos para leitura no equipamento Luminex 200, conforme recomendações do fabricante.

Para aquisição das amostras foi determinada a intensidade média de fluorescência considerando 50 microesferas por analito avaliado no equipamento Bio-Plex 200 (Bio-Rad Laboratories, California, EUA), utilizando o software Luminex xPONENT versão 3.1 (Merck Millipore, Massachusetts, EUA). As concentrações dos biomarcadores foram determinadas a partir da curva-padrão, utilizando o quinto parâmetro logístico para ajuste dos dados. As intensidades médias de fluorescência foram transformadas em concentrações (pg/mL). Todas as análises foram realizadas utilizando o software Bio-Plex Manager™ versão 6.1 (Bio-Rad Laboratories, California, EUA).

4.8 Estratégias de análise

As análises estatísticas para avaliação do perfil de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento, foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad San Diego, CA, EUA). Primeiramente foi realizada análise para confirmação do caráter não paramétrico dos dados. Para análise comparativa entre

dois grupos independentes, foi empregado o teste não paramétrico Mann-Witney. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

Para as análises de correlação foi empregado o teste de Spearman's (rS) Rank. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. Foram consideradas correlações fracas valores de índice "r" de até 0,3, correlações moderadas de 0,4 a 0,6 e correlações fortes acima de 0,7, conforme descrito por Taylor e colaboradores (1990).

Para realização de análise panorâmica global dos resultados, que permitisse melhor visualização e compreensão geral do trabalho, após a etapa de avaliação descritiva, os dados de variável contínua foram transformados em variável categórica. Para análise de assinatura ascendente de alto produtores, foi calculada a mediana global da concentração em pg/mL para cada biomarcador plasmático e presente no exsudato inflamatório dos indivíduos dos grupos SL, NL, LC-EV e LC-IL. Então, a partir da mediana global, foi calculado o percentual de alto produtores de cada biomarcador nos grupos de estudo avaliados (SL, NL, LC-EV e LC-IL). Os indivíduos foram considerados alto produtores de cada biomarcador quando apresentaram valores acima da mediana global (ponto de corte – percentil 50). A representação gráfica em ordem crescente, ou seja, de forma ascendente, destaca claramente os biomarcadores mais relevantes.

Outra estratégia utilizada foi o Diagrama de Venn, que se trata de uma ilustração em que se mostra um conjunto de interseções (\cap) entre dois ou mais grupos. Para a criação do diagrama foi utilizado o software Bioinformatics & Evolutionary Genomics, disponível em <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Neste software foi gerada uma tabela e um gráfico, por meio do diagrama, que indicava quais os atributos compartilhados e exclusivos entre os grupos de estudo avaliados (SL, NL, LC-EV e LC-IL).

5. Resultados

Primeiramente serão apresentados os resultados de avaliação do perfil de biomarcadores imunológicos (quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e moduladoras e fatores de crescimento) em amostras de plasma e do exsudado inflamatório dos grupos: controle sem lesão cutânea (SL), lesão de origem não leishmaniótica (NL), casos de leishmaniose cutânea tratados com Glucantime® endovenoso (LC-EV) e casos de leishmaniose cutânea tratados com Glucantime® intralesional (LC-IL). Para essa avaliação, foram usadas abordagens comparativas convencionais e de assinatura ascendente para melhor visualização e compreensão dos dados. Na sequência, foram utilizadas análises de compartilhamento de atributos entre os grupos pelo Diagrama de Venn e análises de correlação de biomarcadores em cada um dos grupos avaliados.

Após o término dessa etapa de análise dos dados, iremos avaliar o perfil de biomarcadores imunológicos especificamente no grupo LC-IL considerando o tempo de evolução da lesão cutânea. Assim, foram consideradas como lesões recentes (IL-LR), aquelas com evolução de até dois meses e lesões tardias (IL-LT), aquelas com mais de dois meses de evolução. Os dados desses subgrupos de pacientes com leishmaniose cutânea tratados com Glucantime® intralesional foram reanalisados e apresentados seguindo as mesmas estratégias/abordagens descritas acima.

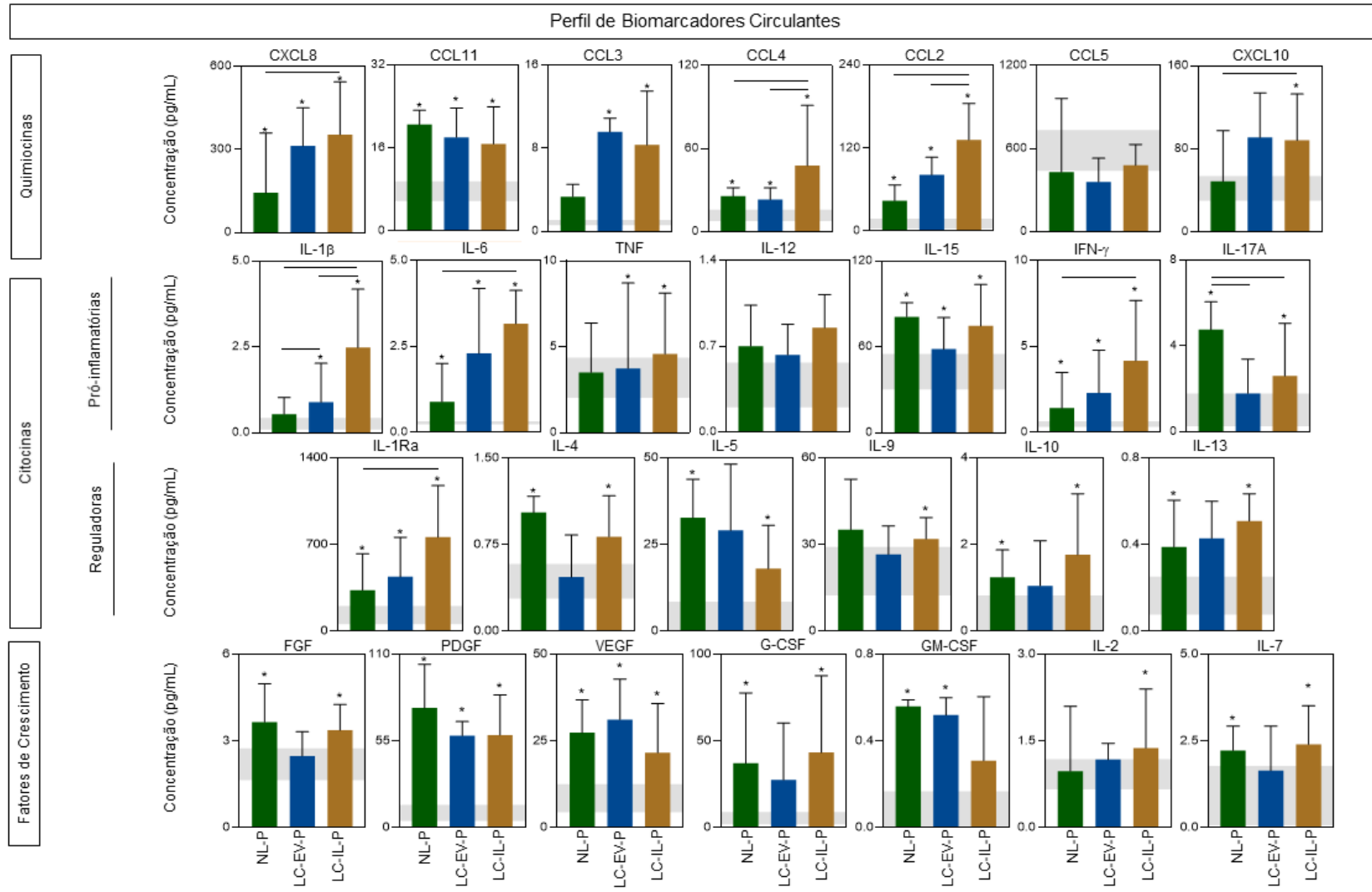
5.1 Avaliação do perfil de biomarcadores imunológicos presentes no plasma e no exsudato inflamatório de pacientes com lesões cutâneas

Os resultados demonstraram que, em geral, os pacientes NL, LC-EV e LC-IL apresentam concentrações mais elevadas de biomarcadores imunológicos no plasma e no exsudato inflamatório (Figuras 4 e 5), quando comparados ao grupo controle sem lesão (SL).

Entre os grupos com lesão, observou-se maior concentração plasmática das quimiocinas CCL4 e CCL2 no grupo LC-IL-P quando comparado aos grupos NL-P e LC-EV-P. Maior concentração plasmática de CXCL10 foi observada nos grupos LC-

EV-P e LC-IL-P quando comparados ao grupo NL-P (Figura 4). Nos resultados relativos à concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias, foi possível observar maior nível de IL-6 e IFN- γ no grupo LC-IL-P quando comparado ao grupo NL-P. Aumento e diminuição das concentrações de IL1 β e IL-17A, respectivamente, foram observados nos grupos LC-EV-P e LC-IL-P, quando comparados ao grupo NL-P (Figura 4). Já em relação às citocinas moduladoras, os dados demonstraram apenas maior produção de IL-1Ra nos grupos LC-EV-P e LC-IL-P quando comparados ao grupo NL-P (Figura 4). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada nas análises do perfil de fatores de crescimento circulantes entre os grupos com lesão cutânea avaliados (Figura 4).

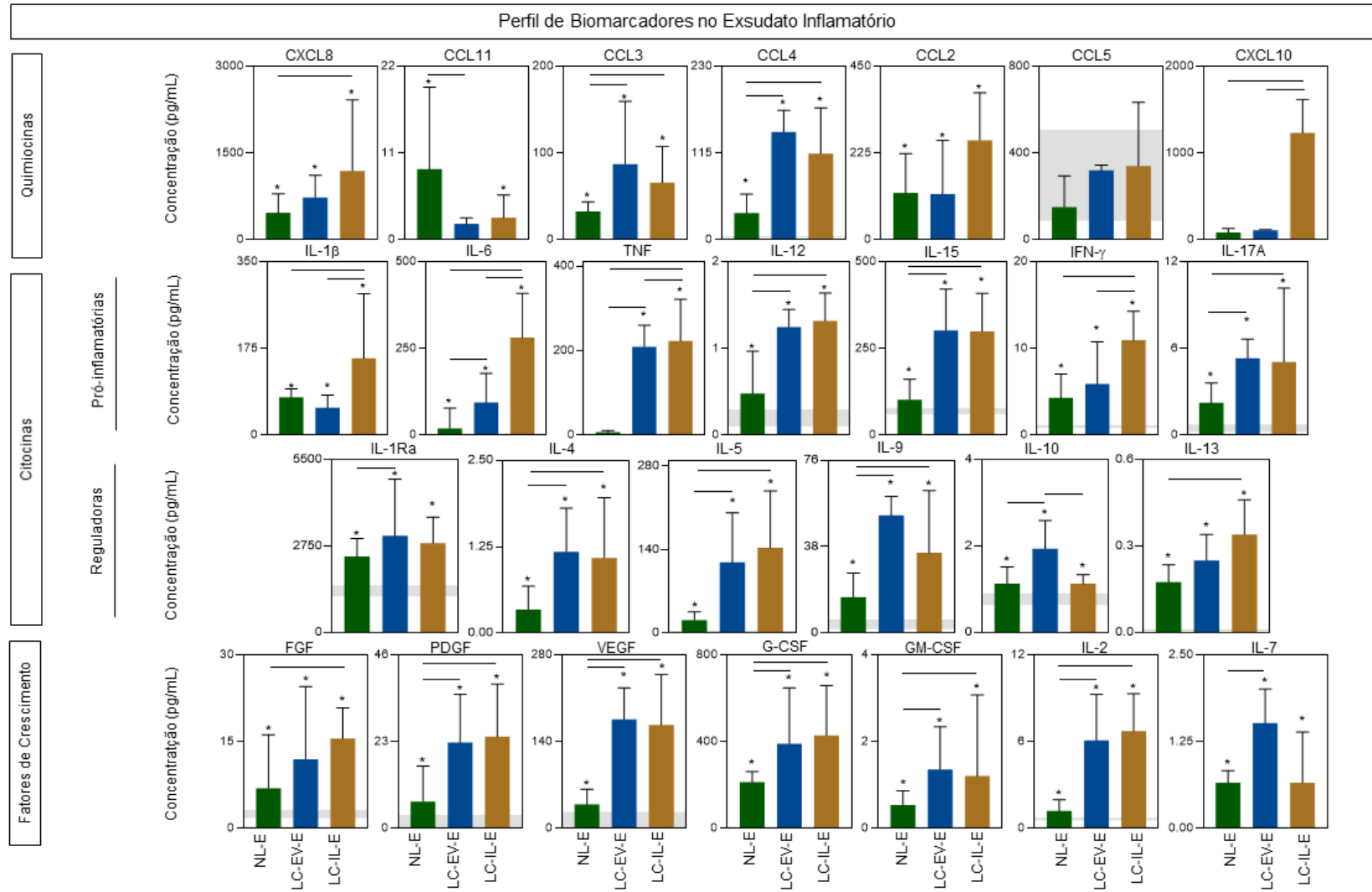
Figura 4: Perfil de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e moduladoras e fatores de crescimento no plasma de indivíduos saudáveis e com lesão cutânea.



As concentrações plasmáticas das quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas moduladoras e fatores de crescimento estão mostrados em picogramas por mililitros (pg/mL) em gráficos de barra destacando a mediana e o intervalo interquartil. A faixa cinza na horizontal representa o intervalo de confiança de 95% dos valores observados nas concentrações de cada biomarcador do grupo controle saudável. O grupo com lesão não leishmaniótica (NL-P) está representado pela cor verde, o grupo dos casos positivos para LC tratados com Glucantime® endovenoso (LC-EV-P) está representado pela cor azul e o grupo dos casos positivos para LC tratados com Glucantime® intralesional (LC-IL-P) está representado pela cor amarelo escuro. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ e estão representadas por linhas conectoras para comparações entre os grupos com lesão cutânea e por asterisco (*) para comparações com o grupo controle saudável. FONTE: Própria autoria.

A análise do perfil de quimiocinas presentes no exsudato inflamatório mostrou maior concentração de CCL3 e CCL4 nos grupos LC-EV-E e LC-IL-E quando comparados ao grupo NL-E. LC-IL-E apresentou ainda maior produção de CXCL8 e CXCL10 quando comparado aos outros grupos estudados (Figura 5). É bastante evidente o perfil altamente inflamatório presente no grupo LC-IL-E. Os dados mostraram elevada concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12 e IFN- γ nesse grupo quando comparado aos grupos NL-E e LC-EV-E. Observa-se ainda aumento de IL-15 e IL-17A em LC-IL-E quando comparado ao grupo NL-E apenas. Pacientes tratados com Glucantime® endovenoso apresentaram maior produção das citocinas IL-6, TNF, IL-12, IL-15 e IL-17A quando comparados ao grupo NL-E (Figura 5). Já em relação às citocinas moduladoras, observa-se maior produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 nos grupos LC-EV-E e LC-IL-E quando comparados ao grupo NL-E. Destaca-se a elevada produção de IL-1Ra e principalmente IL-10 no grupo LC-EV-E, quando comparado aos grupos NL-E e LC-IL-E (Figura 5). As análises do perfil de fatores de crescimento mostraram maiores níveis dos fatores de crescimento avaliados (FGF, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF IL-2 e IL-7) nos grupos LC-EV-E e LC-IL-E quando comparados ao grupo de paciente com úlceras derivadas de outras patologias (NL-E) (Figura 5).

Figura 5: Perfil de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e moduladoras e fatores de crescimento no exsudato inflamatório de indivíduos saudáveis e com lesão cutânea.



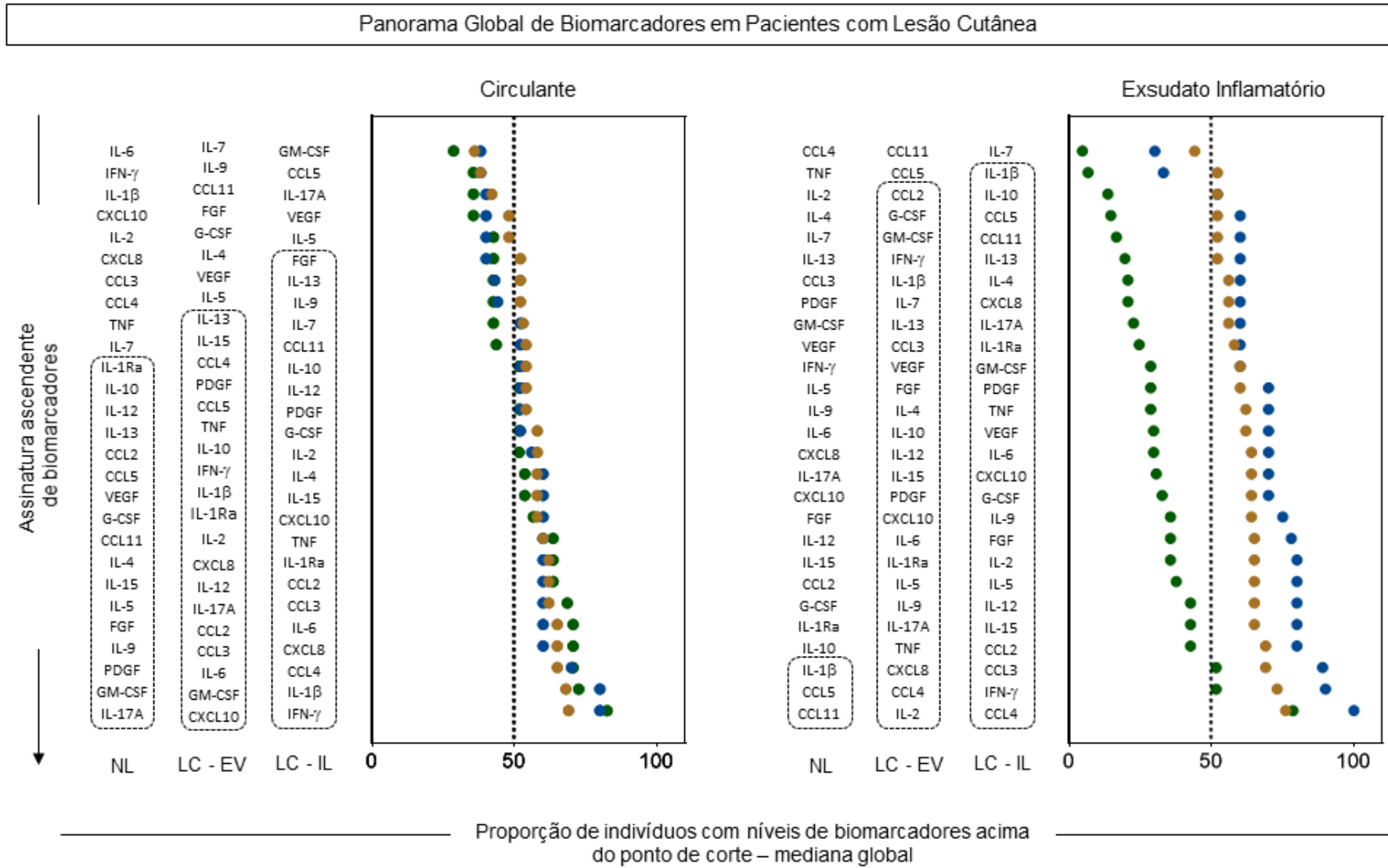
As concentrações plasmáticas das quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas moduladoras e fatores de crescimento estão mostrados em picogramas por mililitros (pg/mL) em gráficos de barra destacando a mediana e o intervalo interquartil. A faixa cinza na horizontal representam o intervalo de confiança de 95% dos valores observados nas concentrações de cada biomarcador do grupo controle saudável. O grupo com lesão não leishmaniótica (NL-E) está representado pela cor verde, o grupo dos casos positivos para LC tratados com Glucantime® endovenoso (LC-EV-E) está representado pela cor azul e o grupo dos casos positivos para LC tratados com Glucantime® intralesional (LC-IL-E) está representado pela cor amarelo escuro. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ e estão representadas por linhas conectoras para comparações entre os grupos com lesão cutânea e por asterisco (*) para comparações com o grupo controle saudável. FONTE: Própria autoria.

5.2 Análise comparativa da assinatura ascendente de biomarcadores em pacientes com lesões cutâneas

Foi realizada uma análise comparativa do perfil de biomarcadores entre os grupos NL, LC-EV e LC-IL utilizando sobreposição das assinaturas ascendentes de biomarcadores de cada grupo (Figura 6). Esta estratégia foi utilizada para selecionar biomarcadores em que mais de 50% dos indivíduos, chamados alto produtores, apresentassem concentração acima da mediana global.

Referente às assinaturas de biomarcadores circulantes, observou-se aumento crescente de pacientes alto produtores quando avaliamos os grupos NL, LC-EV e LC-IL (Figura 6). Interessantemente, quando avaliamos as assinaturas de biomarcadores presentes no exsudato inflamatório, foi possível observar elevado número de alto produtores de quase todos os biomarcadores estudados nos grupos LC-EV e LC-IL quando comparados ao grupo NL que apresentou apenas alto produtores de três (IL-1 β , CCL11 e CCL5), dos 27 biomarcadores estudados (Figura 6). Esses dados de assinatura ascendente permitiram uma análise panorâmica dos resultados, de fácil visualização e que corroboraram os resultados apresentados nas figuras 4 e 5 acima.

Figura 6 : Panorama global de biomarcadores em pacientes com lesões cutâneas.



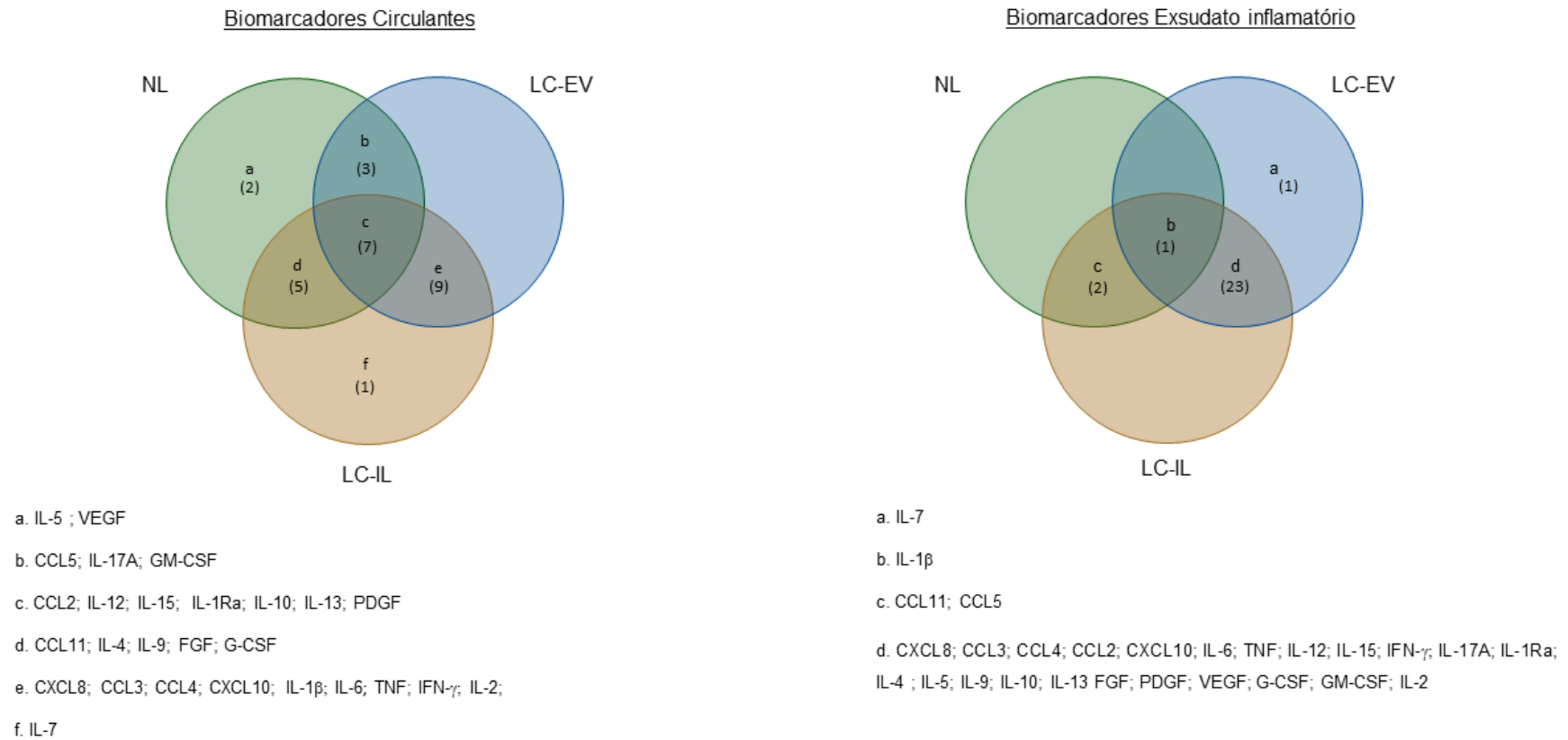
As assinaturas ascendentes foram construídas para os biomarcadores quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas moduladoras e fatores de crescimento. O grupo com lesão não leishmaniótica (NL) está representado pela cor verde, o grupo dos casos positivos para LC tratados com Glucantime® endovenoso (LC-EV) está representado pela cor azul e o grupo dos casos positivos para LC tratados com Glucantime® intralesional (LC-IL) está representado pela cor amarelo escuro. Os dados contínuos foram convertidos em variáveis categóricas e os resultados apresentados como a proporção (%) de pacientes com níveis de biomarcadores acima da mediana global (ponto de corte) calculada para cada biomarcador. Os resultados foram apresentados como assinaturas de biomarcadores ascendentes para cada grupo de estudo. Biomarcadores com proporção de alto produtores acima do percentil 50 foram destacados por retângulos tracejados à esquerda de cada gráfico. FONTE: Própria autoria.

5.3 Análise de atributos compartilhados e exclusivos em pacientes com lesões cutâneas

O diagrama de Venn (Figura 7) foi construído para identificar os atributos exclusivos e compartilhados entre os grupos avaliados. Foram considerados os biomarcadores acima de 50% de cada grupo a partir da mediana global. Com os resultados da análise dos biomarcadores circulantes foi possível identificar sete atributos compartilhados entre os grupos NL, LC-EV e LC-IL, sendo a maioria deles citocinas moduladoras. Foram encontrados nove atributos compartilhados entre os pacientes com leishmaniose (LC-EV e LC-IL), com predominância das quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. No exsudato inflamatório, apenas um atributo foi compartilhado entre os três grupos avaliados. O maior número de atributos compartilhados foi encontrado entre os grupos LC-EV e LC-IL, com 23 biomarcadores, estando presentes todas as citocinas pró-inflamatórias e moduladoras e a maioria dos fatores de crescimento e das quimiocinas avaliadas.

Figura 7: Diagrama de Venn de biomarcadores em pacientes com lesões cutâneas.

Diagrama de Venn de Biomarcadores em Pacientes com Lesão Cutânea



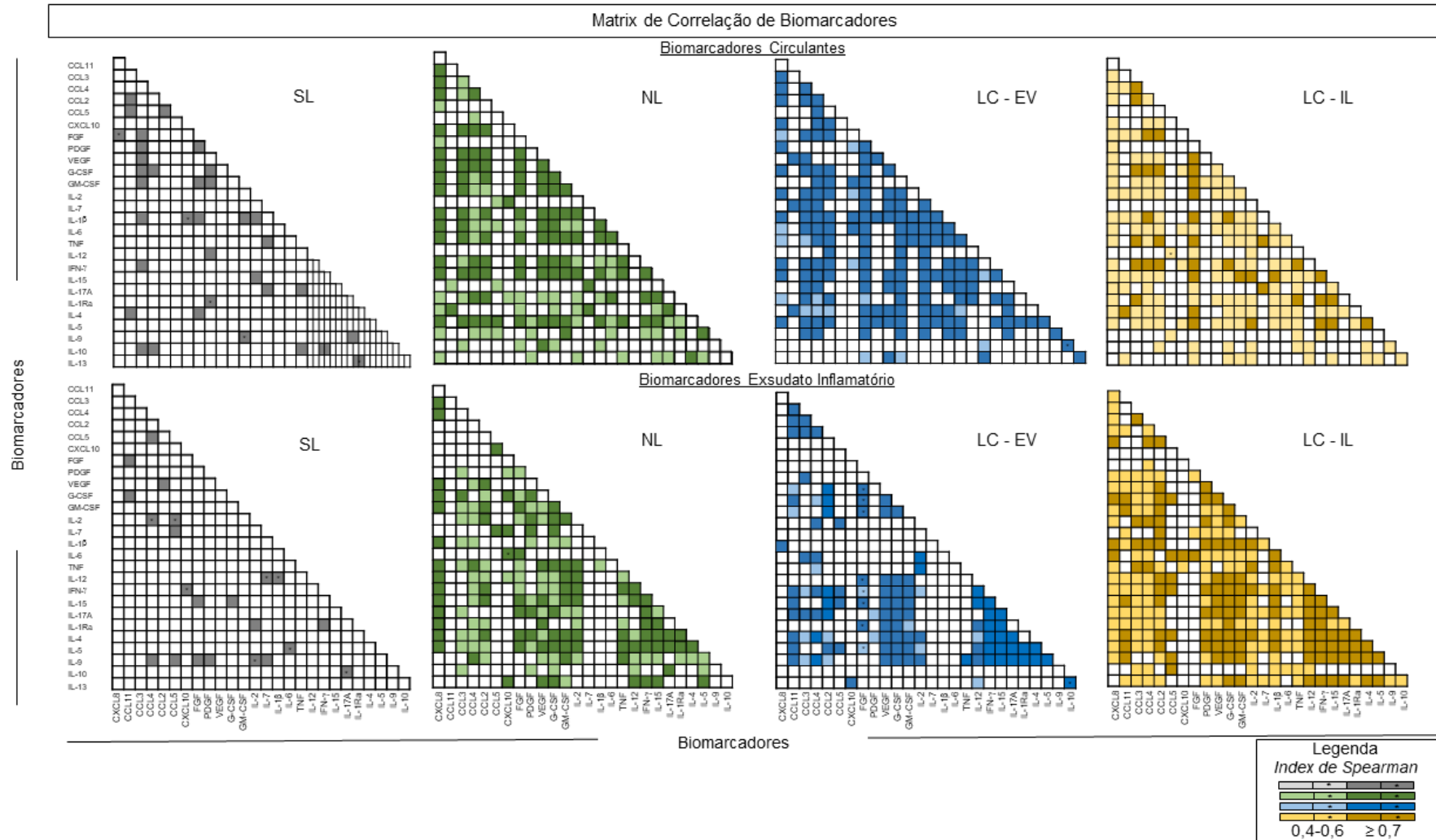
Os diagramas de Venn foram construídos para avaliar o perfil de atributos exclusivos ou compartilhados entre os grupos NL, LC-EV e LC-IL. Essa abordagem permite determinar as relações entre os grupos de estudo, destacando semelhanças e diferenças no perfil dos biomarcadores circulantes e presentes no exsudato inflamatório dos grupos estudados. Os valores (números) internos no diagrama representam o número de biomarcadores exclusivos ou compartilhados entre os grupos. As letras representam a lista de biomarcadores, destacada logo abaixo, exclusivos ou compartilhados dos grupos. FONTE: Própria autoria.

5.4 Matriz de correlações dos biomarcadores em pacientes com lesões cutâneas

Para uma visão panorâmica das redes de conexões entre os biomarcadores, uma matriz de correlações foi elaborada (Figura 8). Os dados da matriz, evidenciam diferenças no perfil de conexões de biomarcadores circulantes e presentes no exsudato inflamatório entre os quatro grupos avaliados. Ao avaliarmos o perfil de conexões entre os biomarcadores circulantes, foi possível observar que o grupo controle sem lesão (SL), apresentou poucas conexões, sendo algumas negativas. Neste grupo houve forte correlação entre CCL3 e fatores de crescimento. Entre os pacientes com lesão cutânea, observou-se uma nítida diferença no perfil de correlação dos biomarcadores circulantes. Entre os pacientes que possuem lesão não leishmaniótica (NL) existem diversas conexões moderadas e fortes. Nos pacientes tratados com Glucantime® endovenoso (LC-EV), as conexões são majoritariamente fortes, estando em evidência conexões entre as quimiocinas com os fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias. Já no grupo LC-IL, observou-se um padrão heterogêneo de biomarcadores com diversas conexões, na sua maioria conexões moderadas (Figura 8).

Quando analisadas as conexões de biomarcadores presentes no exsudato inflamatório, ou seja, no microambiente da lesão, foi observado perfil inverso ao descrito nas análises de biomarcadores circulantes, com maior número de conexões fortes e moderadas no grupo LC-IL, e uma considerável perda de correlações nos grupos NL e LC-EV. As conexões presentes no grupo NL foram heterogêneas variando entre moderadas e fortes. No grupo LC-EV foi possível observar correlações fortes, especialmente entre fatores de crescimento e algumas citocinas pró-inflamatórias e moduladoras. Todas as conexões com FGF desse grupo, foram negativas, ou seja, a redução desse fator de crescimento reflete no aumento dos biomarcadores correlacionados. De maneira interessante, destacam-se as conexões observadas no grupo LC-IL, onde ocorreu aumento considerável de conexões fortes entre citocinas pró-inflamatórias e moduladoras e, entre fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias (Figura 8).

Figura 8: Matrix de Correlação de Biomarcadores.



Matrizes abrangentes de redes de biomarcadores foram construídas com base nas pontuações de correlação entre quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas moduladoras e fatores de crescimento circulantes e presentes no exsudato inflamatório dos grupos SL, NL, LC-EV e LC-IL. Nas matrizes triangulares, cada quadrado representa o índice de correlação entre um par de biomarcadores. Os gradientes das cores foram usados para indicar a força da correlação

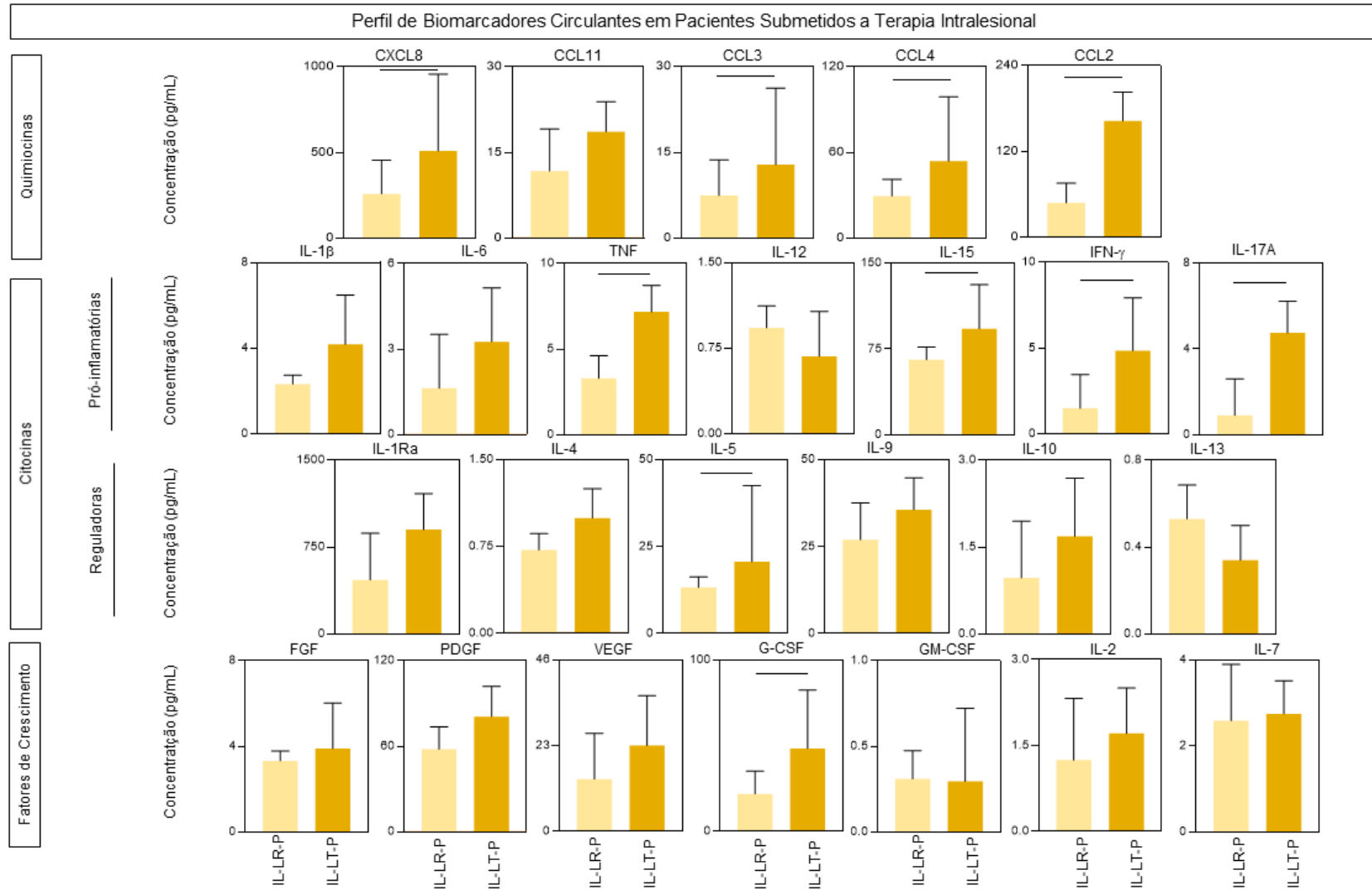
entre os biomarcadores que apresentassem resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$), sendo as cores mais claras representativas do índice r de correlações moderadas (de 0,4 a 0,6) e as cores mais escuras representativas do índice r de correlações fortes ($> 0,7$), respectivamente. Além disso, o asterisco (*) dentro dos quadrados foi usado para indicar correlações negativas entre os biomarcadores. Correlações não significativas estão representadas por quadrados brancos. FONTE: Própria autoria.

5.5 Avaliação do perfil de biomarcadores imunológicos presentes no plasma e no exsudato inflamatório de pacientes tratados com Glucantime® intralesional por tempo de lesão

Com o propósito de caracterizar possíveis diferenças no perfil de resposta imune considerando o tempo de evolução das lesões cutâneas, os níveis de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas moduladoras e fatores de crescimento foram mensurados no plasma e no exsudato inflamatório dos pacientes do grupo LC-IL subdivididos em lesão recente (IL-LR) e lesão tardia (IL-LT) (Figuras 9 e 10).

Pela análise dos resultados foi possível observar maior concentração plasmática de biomarcadores, principalmente das quimiocinas (CXCL8, CCL3, CCL4 e CCL2) e das citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-15, IFN- γ e IL-17A), em pacientes com lesões tardias (IL-LT-P). Também maior produção da citocina moduladora IL-5 e do fator de crescimento G-CSF foi observada no grupo IL-LT-P (Figura 9).

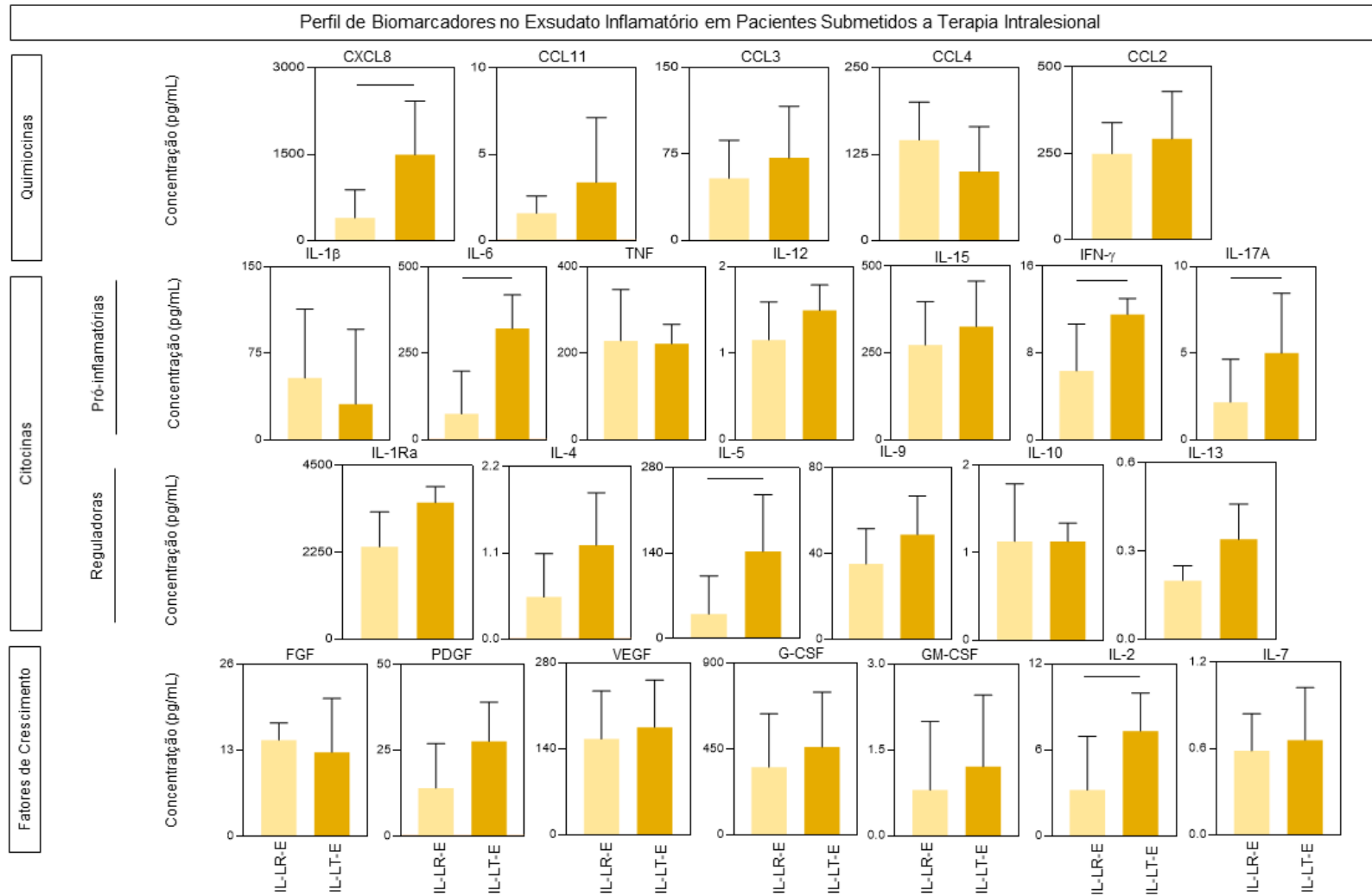
Figura 9: Perfil de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e moduladoras e fatores de crescimento no plasma de indivíduos submetidos a terapia intralesional classificadas por tempo de lesão.



As concentrações plasmáticas das quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas moduladoras e fatores de crescimento estão mostrados em picogramas por mililitros (pg/mL) em gráficos de barra destacando a mediana e o intervalo interquartil. O grupo com lesão recente (IL-LR-P) e que recebeu tratamento com Glucantime® intralesional está representado pela cor amarelo claro e o grupo com lesão tardia (IL-LT-P) e que recebeu tratamento com Glucantime® intralesional está representado pela cor amarelo escuro. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram consideradas quando $p < 0,05$ e estão representadas por linhas conectoras. FONTE: Própria autoria.

No exsudato inflamatório, destacam os elevados níveis da quimiocina CXCL8 e das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-15 e IL-17A em pacientes com lesões tardias (IL-LT-E). Foi possível observar também maior concentração da citocina moduladora IL-5 do fator de crescimento IL-2 nesse grupo de estudo quando comparado aos pacientes com IL-LR-E (Figura 10).

Figura 10: Perfil de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e moduladoras e fatores de crescimento presentes no exsudato inflamatório de pacientes submetidos a terapia intralesional classificados por tempo de lesão.



As concentrações das quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas moduladoras e fatores de crescimento estão mostrados em picogramas por mililitro (pg/mL) em gráficos de barra destacando a mediana e o intervalo interquartil. O grupo com lesão recente (IL-LR-E) e que recebeu tratamento com Glucantime® intralesional está representado pela cor amarelo claro e o grupo com lesão tardia (IL-LT-E) e que recebeu tratamento com Glucantime® intralesional está representado pela cor amarelo escuro. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram consideradas quando $p < 0,05$ e estão representadas por linhas conectoras. FONTE: Própria autoria.

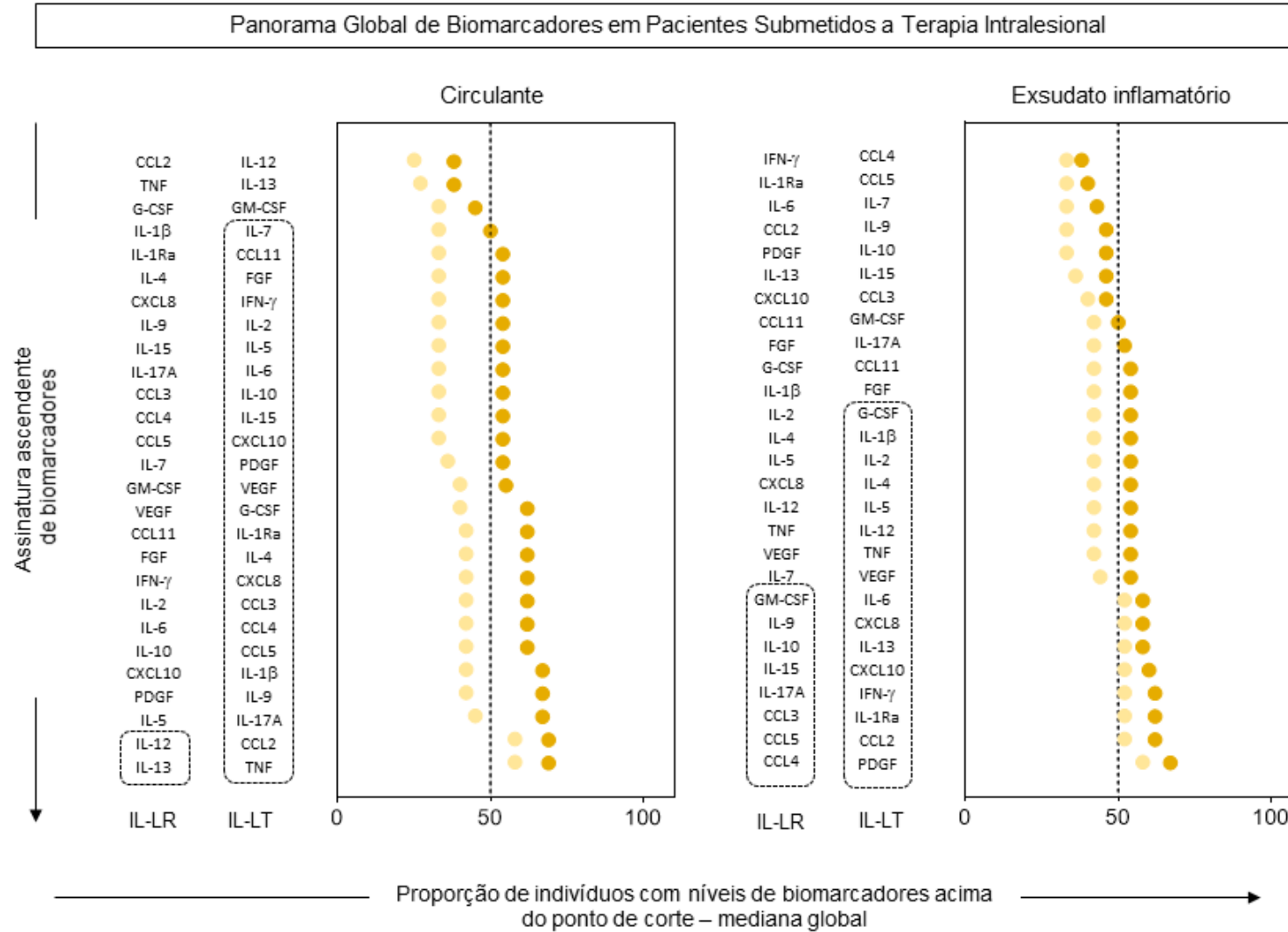
5.6 Análise comparativa da assinatura ascendente de biomarcadores em pacientes tratados com Glucantime® intralesional por tempo de lesão

Uma segunda assinatura ascendente de biomarcadores foi construída levando em consideração o tempo de lesão dos pacientes tratados com Glucantime® intralesional (LC-IL) (Figura 11). Essa estratégia foi utilizada para selecionar biomarcadores em que mais de 50% dos pacientes, chamados alto produtores, apresentassem concentração acima da mediana global. Como descrito anteriormente, a assinatura ascendente foi graficamente apresentada pela sobreposição das assinaturas ascendentes dos grupos IL-LR e IL-LT.

Somente para a citocina pró-inflamatória IL-12 e a citocina moduladora IL-13 circulantes foram encontrados pacientes com produção acima do percentil 50 no grupo lesão recente (IL-LR). Já no grupo de pacientes com lesões tardias (IL-LT) observou-se a presença de alto produtores (acima de 75%) para a maioria dos biomarcadores, destacando-se os alto produtores da quimiocina CCL2, das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF e IL-17A e da citocina moduladora IL-9 (Figura 11).

No exsudato inflamatório também foi observado o elevado percentual de alto produtores de diferentes biomarcadores no grupo IL-LT. Em pacientes com lesões recentes observou-se a presença de alto produtores das quimiocinas CCL4, CCL5 e CCL3 e algumas citocinas (IL-15, IL-17A, IL-9 e IL-10), com perfil bem balanceado. Nos pacientes com lesões tardias, apesar do predomínio de alto produtores de citocinas moduladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5 e IL-13), destaca-se a presença de alto produtores de biomarcadores inflamatórios IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12 e principalmente IFN- γ e CXCL10 (Figura 11).

Figura 11: Panorama global de biomarcadores em pacientes submetidos a terapia intralesional classificados por tempo de lesão.

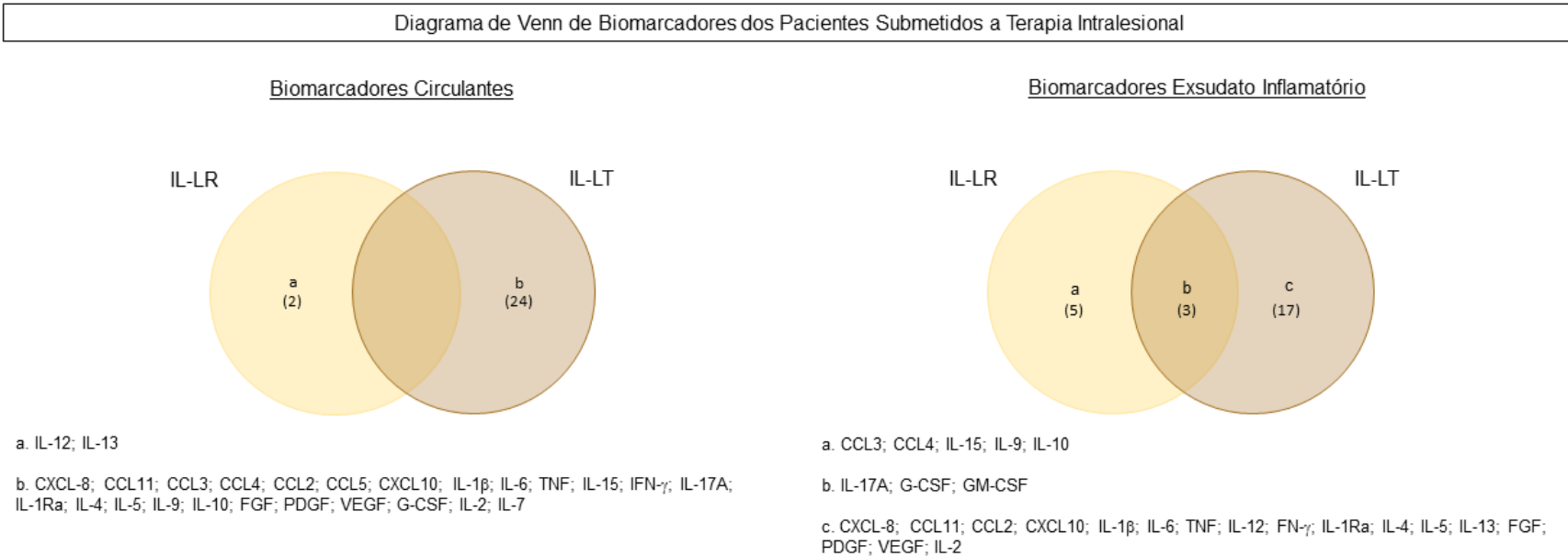


As assinaturas ascendentes foram construídas para os biomarcadores quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas moduladoras e fatores de crescimento. O grupo com lesão recente (IL-LR) está representado pela cor amarelo claro e o grupo com lesão tardia (IL-LT) está representado pela cor amarelo escuro. Os dados contínuos foram convertidos em variáveis categóricas e os resultados apresentados como a proporção (%) de pacientes com níveis de biomarcadores acima da mediana global (ponto de corte) calculada para cada biomarcador. Os resultados foram apresentados como assinaturas de biomarcadores ascendentes para cada grupo de estudo. Biomarcadores com proporção de alto produtores acima do percentil 50 foram destacados por retângulos tracejados à esquerda de cada gráfico. FONTE: Própria autoria.

5.7 Análise de atributos compartilhados e exclusivos em pacientes tratados com Glucantime® intralesional por tempo de lesão

Diagramas de Venn foram construídos considerando o tempo de lesão dos pacientes tratados com Glucantime® intralesional (Figura 12). Em relação aos biomarcadores circulantes, nenhum atributo foi compartilhado entre os grupos lesão recente e tardia, e apenas dois atributos (IL-12 e IL-13) foram exclusivos para o grupo de pacientes com lesões recentes (IL-LR). Por outro lado, 24 atributos foram exclusivos para o grupo de pacientes com lesões tardias (IL-LT) (Figura 12). Nos resultados referentes ao perfil de biomarcadores presentes no exsudato inflamatório, três atributos foram compartilhados, sendo eles IL-17A, G-CSF e GM-CSF entre os grupos IL-LR e IL-LT. Como atributos exclusivos, foram observados cinco no grupo de pacientes com lesões recentes (IL-LR) e 17 no grupo de pacientes com lesões tardias (IL-LT).

Figura 12: Diagrama de Venn de biomarcadores em pacientes submetidos a terapia intralesional classificados por tempo de lesão.



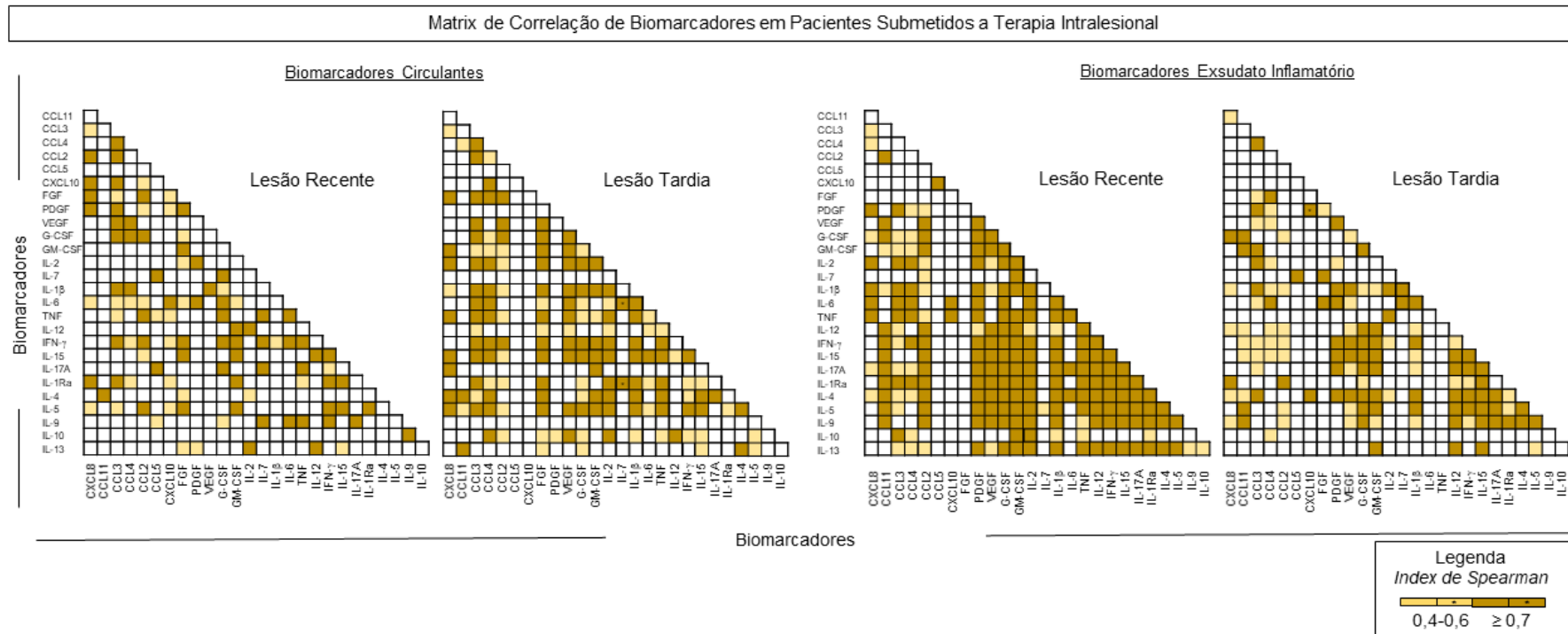
Os diagramas de Venn foram construídos para avaliar o perfil de atributos exclusivos e compartilhados entre os grupos IL-LR e IL-LT. Essa abordagem permite determinar as relações entre os grupos de estudo, destacando semelhanças e diferenças no perfil dos biomarcadores circulantes e presentes no exsudato inflamatório dos grupos estudados. Os valores (números) internos no diagrama representam o número de biomarcadores exclusivos ou compartilhados entre os grupos. As letras representam a lista de biomarcadores, destacada logo abaixo, exclusivos ou compartilhados dos grupos. FONTE: Própria autoria.

5.8 Matriz de correlações dos biomarcadores em pacientes tratados com Glucantime® intralesional por tempo de lesão

A matriz de correlação foi construída subdividindo o grupo dos pacientes tratados com Glucantime® intralesional (LC-IL) por tempo de lesão (Figura 13). Nessa estratégia de análise ficaram notórias as diferenças no perfil de correlação dos biomarcadores em pacientes com lesões recentes e tardias, especialmente quando avaliamos o perfil de correlação de biomarcadores presentes no exsudato inflamatório.

Na matriz de biomarcadores circulantes, tanto no grupo de pacientes com lesões recentes (IL-LR) quanto no grupo de pacientes com lesões tardias (IL-LT), foi possível visualizar uma heterogeneidade de biomarcadores fortemente conectados, principalmente no grupo IL-LT (Figura 13). Já no exsudato inflamatório, ou seja, no microambiente da lesão, as diferenças ficam bastante evidentes. Embora pacientes com lesões recentes (IL-LR) apresentem menor produção de diversos biomarcadores, o que refletiu na assinatura ascendente e diagrama de Venn, observou-se nesse grupo conexões fortes entre fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias e moduladoras, também são perceptíveis conexões fortes entre as citocinas moduladoras. Já no grupo de pacientes com lesões tardias (IL-LT), parte dessas conexões são perdidas, estando em evidência as correlações fortes entre as citocinas moduladoras e correlações moderadas entre quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias.

Figura 13: Matrix de Correlação de Biomarcadores em pacientes submetidos a terapia intralesional classificadas por tempo de lesão.



Matrizes abrangentes de redes de biomarcadores foram construídas com base nas pontuações de correlação entre quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas moduladoras e fatores de crescimento circulantes e presentes no exsudato inflamatório dos pacientes dos grupos IL-LR e IL-LT. Nas matrizes triangulares, cada quadrado representa o índice de correlação entre um par de biomarcadores. Os gradientes das cores foram usados para indicar a força da correlação entre os biomarcadores que apresentassem resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$), sendo as cores mais claras representativas do índice r de correlações moderadas (de 0,4 a 0,6) e as cores mais escuras representativas do índice r de correlações fortes ($> 0,7$), respectivamente. Além disso, o asterisco (*) dentro dos quadrados foi usado para indicar correlações negativas entre os biomarcadores. Correlações não significativas estão representadas por quadrados brancos. FONTE: Própria autoria.

6. Discussão

Apesar dos diversos estudos de resposta imune na LC e alguns envolvendo resposta ao tratamento, estudos que avaliam o perfil de biomarcadores imunológicos de pacientes com LCL, tendo como critério a via de administração do Glucantime[®], ainda não foram descritos. Nesse sentido, o presente estudo buscou identificar diferenças e semelhanças no perfil de diversos mediadores imunológicos solúveis circulantes e no local da lesão de pacientes clinicamente selecionados para tratamento com Glucantime[®] pelas vias de administração endovenosa e intralesional. Dessa forma, a apresentação clínica da doença e a resposta ao tratamento pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo o estado imunológico do indivíduo.

Conhecer o perfil basal de biomarcadores imunológicos circulantes e presentes no exsudato inflamatório das lesões cutâneas de pacientes com LCL, considerando os critérios clínicos e recomendações do MS para tratamento intralesional, poderá reforçar a escolha da terapia intralesional e também possibilitará a compreensão da resposta ao tratamento associada à terapia intralesional.

Na forma cutânea da leishmaniose observa-se a presença de um infiltrado dérmico rico em macrófagos, linfócitos e plasmócitos, principalmente. A presença de infiltrado dérmico repleto de células de defesa, faz da resposta imune celular, condição imprescindível para o controle do parasito e cicatrização de feridas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; GOTO; LINDOSO, 2012). Para que essas células imunes possam chegar ao local da lesão, serem ativadas e atuarem contra o parasito, uma série de mediadores solúveis importantes precisam ser secretados e, se de maneira orquestrada, promoverem interações entre os componentes imunológicos, favorecerão o controle da doença e a cicatrização das lesões.

A resposta imune típica encontrada em pacientes com LCL é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, predominantemente do tipo 1, como IL-12, TNF e IFN- γ (COUTINHO, et. al., 2002; GOMES-SILVA, et. al., 2007; KIMA; SOONG, 2013). A IL-12 é a principal citocina que atua na diferenciação da resposta Tipo 1 e produção de IFN-g pelos linfócitos TCD4⁺ (COSTA-SILVA, 2014; VOLPEDO, 2021; CARVALHO, et. al., 2021). Na LCL tem sido descrito também aumento de IL-1 β

(FERNANDA, et. al., 2021). A IL-1 β é um importante mediador da resposta imune inata e adaptativa. No entanto, elevados níveis dessa citocina pró-inflamatória pode desencadear um exacerbado processo inflamatório que dificulta a cicatrização de lesões na LC (NOVAIS, et. al., 2017; PENICHE, et al, 2017). Além disso, alguns estudos têm mostrado que IL-1 β pode estar diretamente relacionada com o aumento dos níveis de IL-6 e IL-17A em processos inflamatórios (DINARELLO, 2011). A IL-6 é uma potente citocina que atua na resposta imune aguda, mediando os mecanismos para a diferenciação de linfócitos e morte celular e sua secreção é estimulada por IL-17A (MENDONCA, et. al., 2020).

Na LC causada por *L. braziliensis*, as quimiocinas desempenham papel importante na patogênese e eliminação do parasito. É sabido que o próprio parasito induz produção e secreção de diversas quimiocinas no local da infecção. A presença de altos níveis locais de CXCL8 está associada à migração de neutrófilos. Os neutrófilos infectados por sua vez, apresentam perfil inflamatório e secretam altos níveis de quimiocinas e citocinas como: CXCL8, CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4, IL-12 e IFN- γ que atuam no recrutamento de macrófagos e linfócitos T pró-inflamatórios para o local da lesão (CONCEIÇÃO, et. al., 2016; CONCEIÇÃO-SILVA; LEITE-SILVA; MORGADO, 2018). Também as quimiocinas CCL2 e CCL3 podem mediar ativação de macrófagos e produção de óxido nítrico (OGHUMU, et. al., 2010; SCHAERLI, et. al., 2000) e, em associação ao IFN- γ , são responsáveis por atraírem mais monócitos que irão produzir mais CXCL9 e CXCL10, gerando maior *clearance* dos parasitos. Navas e colaboradores (2020) mostraram que a expressão de CCL2 foi significativamente maior nos pacientes em tratamento e curados do que naqueles que tiveram falha terapêutica. Durante o tratamento, essa quimiocina pode favorecer uma resposta cicatrizante. Já CXCL10 está fortemente associada a um perfil de resposta tipo 1 e também ao controle da infecção. Alguns estudos mostram que o CXCL10 pode induzir a produção de IL-12 (LIU, et. al., 2005; VASQUEZ; SOONG, 2006). Essa quimiocina pode contribuir ainda para a atividade citotóxica das células *natural killer* (NK), aumentar a atividade da enzima iNOS e favorecer a morte do parasito. Nossos dados corroboram esses achados, onde observou-se nos pacientes com LCL, aumento das quimiocinas CCL2 e CCL4 e no grupo LC-IL também o aumento de CXCL8 e CXCL10.

Em humanos, IL-17A tem sido associada à inflamação no local da infecção por *L. braziliensis* (BACELLAR, et. al., 2009; KAMMOUN-REBAI, 2016), uma vez que, a ela, tem sido atribuída produção da citocina TNF, fatores de crescimento GM-CSF e G-CSF e síntese das quimiocinas CXCL8 e CXCL10, responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos e células do Tipo 1 (OUYANG, KOLLS; ZHENG, 2008, KORN, et. al., 2009). Alguns trabalhos demonstram que IL-17A poderia estar associada à progressão da doença ou maior dano tecidual (BACELLAR, et. al., 2009, BOAVENTURA, et. al., 2010). No entanto, outros estudos verificaram que essa citocina poderia estar envolvida na autorresolução de lesões ou proteção e resistência à leishmaniose (NOVOA, et. al., 2011). Nossos achados corroboram estes estudos uma vez que demonstramos forte correlação de IL-1b com IL-6 e IL17A na LCL. Nossos dados corroboram ainda a hipótese do papel da IL-17A no controle e resolução das lesões, uma vez que observamos nos nossos dados uma forte correlação de IL-17A com fatores de crescimento celular G-CSF, GM-CSF e a principal citocina pró-inflamatória envolvida no controle do parasitismo, IFN- γ nos grupos LC-EV e LC-IL.

É sugerido por Bourreau e colaboradores (2001) a associação de altos níveis de IL-10 na lesão a falha terapêutica em infecções causadas por *L. guyanensis*, uma vez que a IL-10 regula negativamente a resposta tipo 1 e inibe a maturação de células dendríticas, envolvidas no início da infecção. Sendo assim, a IL-10 poderia ser usada como uma ferramenta preditiva de falha terapêutica, segundo os autores. No entanto, considerando que a presença de resposta Tipo 1 exacerbada pode levar à danos teciduais (FARIA, et. al., 2005; PALMEIRO, et. al., 2012), a resposta balanceada torna-se indispensável para o controle da infecção sem dano tecidual como ocorre na LM (CONCEIÇÃO-SILVA, 2018; KIP, et. al., 2015). Alguns estudos têm mostrado que uma forte resposta imune do tipo 1, com produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF e diminuição da produção de IL-10 pode levar a uma resposta inflamatória exagerada na LC e LM (BACELLAR, et. al., 2002; FARIA, et. al., 2005; OLIVEIRA, et. al., 2011). Em outro estudo, foi demonstrado que células T reguladoras produtoras de IL-10 podem contribuir para redução do dano tecidual e da carga parasitária nas lesões (JI, et. al., 2005). Também é sugerido que à medida que os níveis de IL-10 aumentam em PBMC de pacientes com LCL, TNF também aumenta, mantendo um equilíbrio entre as duas respostas, necessária para o controle da infecção (VOLPEDO, 2021). Nesse sentido, a presença de citocinas reguladoras como IL-4, IL-5, IL-9 e

principalmente de IL-1Ra e IL-10, pode estar associado a uma resposta balanceada, mais modulada, especialmente em pacientes tratados com Glucantime® endovenoso.

Outros biomarcadores importantes nos processos infecciosos são os fatores de crescimento, pois desempenham papéis críticos em todas as fases da infecção: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelamento e reparo. Nesse sentido, estudos clínicos que avaliaram o uso de um ou vários fatores de crescimento, como GM-CSF, PDGF, EGF e FGF para o tratamento de úlceras crônicas, mostraram bons resultados quando utilizados individualmente, mas com melhores resultados quando utilizados em associação na LCL (ROBSON, 1991; MAST; SCHULTZ, 1996). Em nosso estudo, em adição ao perfil de quimiocinas e citocinas descritas acima, foi visto um aumento significativo de fatores de crescimento nos pacientes com LCL (PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF e IL-2), com correlações fortes com citocinas inflamatórias, podendo indicar que ao mesmo tempo em que a infecção está sendo combatida, está ocorrendo o reparo tecidual e cicatrização das lesões.

No grupo de pacientes com lesões não-leishmanióticas, as principais alterações apresentadas no perfil dos biomarcadores avaliados podem ser observadas a nível sistêmico em comparação ao grupo controle (Figuras 4 e 5). Por outro lado, os resultados obtidos evidenciaram uma forte resposta do tipo 1 local nos casos confirmados de LCL (LC-EV e LC-IL), com elevada produção de IL-6, TNF, IL-12, IL-15 e IL-17A. Esse perfil foi ainda mais evidente nos pacientes selecionados para o tratamento via intralesional, onde se observou também maior produção de IL-1 β e IFN- γ (Figuras 4 e 5). Em paralelo, observou-se nos pacientes com LCL, aumento das quimiocinas CCL3 e CCL4 e no grupo LC-IL também houve aumento de CXCL8 e CXCL10, indicando intenso recrutamento de células mono e polimorfonucleares (Figuras 4 e 5). Os dados mostraram ainda, que nos pacientes com LCL, a presença aumentada de fatores de crescimento celular PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF e IL-2 (Figuras 4 e 5). De maneira interessante, foi possível observar também a presença de citocinas reguladoras como IL-4, IL-5 e IL-9. Um perfil mais modulado destaca-se no grupo LC-EV, com presença de elevados níveis de IL-1Ra e IL-10, principal citocina associada à modulação de resposta imune nas leishmanioses (Figuras 4 e 5). Os elevados níveis de biomarcadores circulantes e principalmente os presentes no exsudato inflamatório descritos para os pacientes com LCL acima, foram melhor

visualizados por meio da análise panorâmica dos dados, obtida com as assinaturas ascendentes de alto produtores de cada biomarcador (Figura 6). Além disso, com a análise complementar realizada pelo diagrama de Venn, foi possível identificar o compartilhamento de 23 dos 27 biomarcadores avaliados entre os pacientes tratados com Glucantime® endovenoso e os pacientes submetidos a terapia com o Glucantime® intralesional (Figura 7).

A análise descritiva dos dados indicou diferenças pontuais entre os grupos LC-EV e LC-IL, com tendência a um perfil mais inflamatório em pacientes que atenderam aos critérios clínicos para tratamento com o Glucantime® intralesional e mais modulado em pacientes tratados com o Glucantime® endovenoso, apesar da análise complementar, de visão panorâmica dos dados por meio da assinatura ascendente de alto produtores e diagrama de Venn, ter mostrado muitas semelhanças entre os grupos.

Considerando esses resultados, nós nos questionamos se haveriam conexões distintas entre os biomarcadores nos grupos avaliados que pudessem reforçar as diferenças pontuais observadas na análise descritiva? Ou, se sabendo da presença de alto produtores de diversos biomarcadores e elevado compartilhamento dos mesmos entre LC-EV e LC-IL, haveriam semelhanças também nas conexões desses biomarcadores nos grupos de estudo e nos diferentes compartimentos (sangue periférico e microambiente da lesão) avaliados?

O estudo dessas redes de interações é fundamental para o melhor entendimento da evolução da infecção e resposta ao tratamento. Os dados mostraram um padrão difuso de correlações fortes em pacientes do grupo LC-EV e de correlações moderadas no grupo LC-IL quando avaliamos as conexões entre biomarcadores circulantes. No entanto, no microambiente da lesão, várias conexões foram perdidas nos grupos LC-EV. Nos chamou atenção os agrupamentos de correlações fortes entre fatores de crescimento e citocinas moduladoras, e citocinas pró-inflamatórias e citocinas moduladoras. No grupo LC-IL foi possível observar aumento das conexões e aparecimento de correlações fortes, em sua maioria nos mesmos agrupamentos descritos para o grupo LC-EV, mas com moderadas e fortes conexões também entre mediadores mais inflamatórios, o que reforça o caráter mais pró-inflamatório desse grupo (Figura 8).

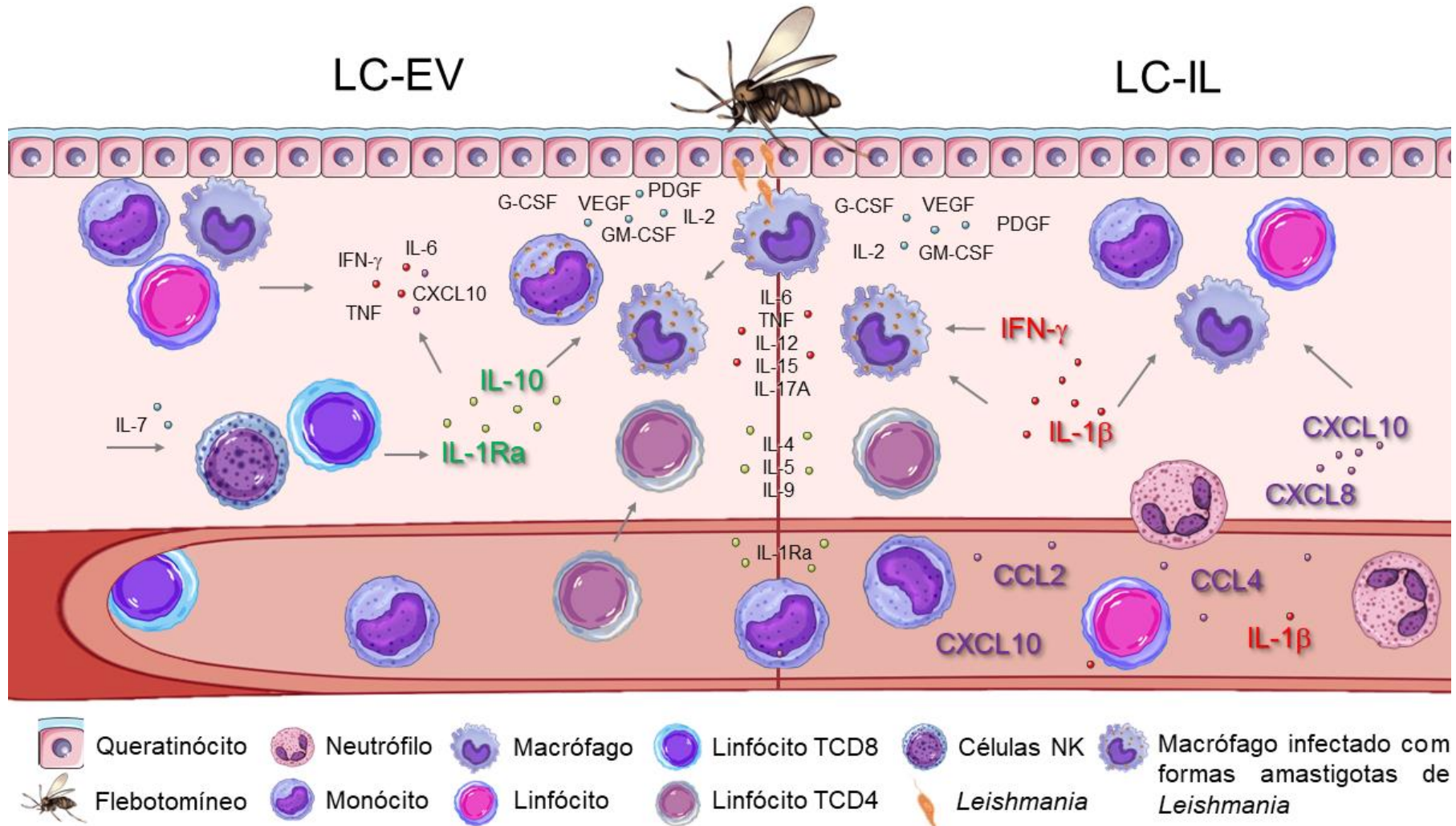
Nossos resultados indicam que as conexões em rede de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento acionadas quando da infecção por *Leishmania*, são fatores importantes para a sobrevivência ou eliminação do parasito e são indicativas de resposta ao tratamento, uma vez que estão associadas ao microambiente da lesão, atuando no recrutamento celular, ativação celular e interações complexas e essenciais ao desfecho da infecção e cicatrização das lesões. Além disso, esses dados evidenciam de maneira mais contundente, o caráter mais pró-inflamatório do grupo LC-IL.

Especificamente no grupo LC-IL, considerando o tempo de evolução da lesão, foi notável a diferença no perfil de biomarcadores apresentado. Ficou evidente a maior produção de biomarcadores em pacientes com lesões tardias, principalmente de biomarcadores circulantes (Figuras 9 e 10). Esse dado pode ser mais bem visualizado nas assinaturas ascendentes de alto produtores (Figura 11) e no diagrama de Venn (Figura 12), em que a maioria dos alto produtores dos biomarcadores analisados apareceram exclusivamente nos casos de lesões tardias.

Além disso, considerando que o tempo de evolução da lesão pode influenciar a resposta imune, o presente estudo também propôs avaliar o perfil de biomarcadores presente em lesões recentes e tardias nos pacientes tratados com Glucantime® intralesional. Para divisão desses grupos, foram consideradas lesões recentes aquelas com até dois meses de evolução e lesões tardias aquelas com mais de dois meses de evolução. Essa categorização foi baseada no trabalho de Carvalho e colaboradores (1985).

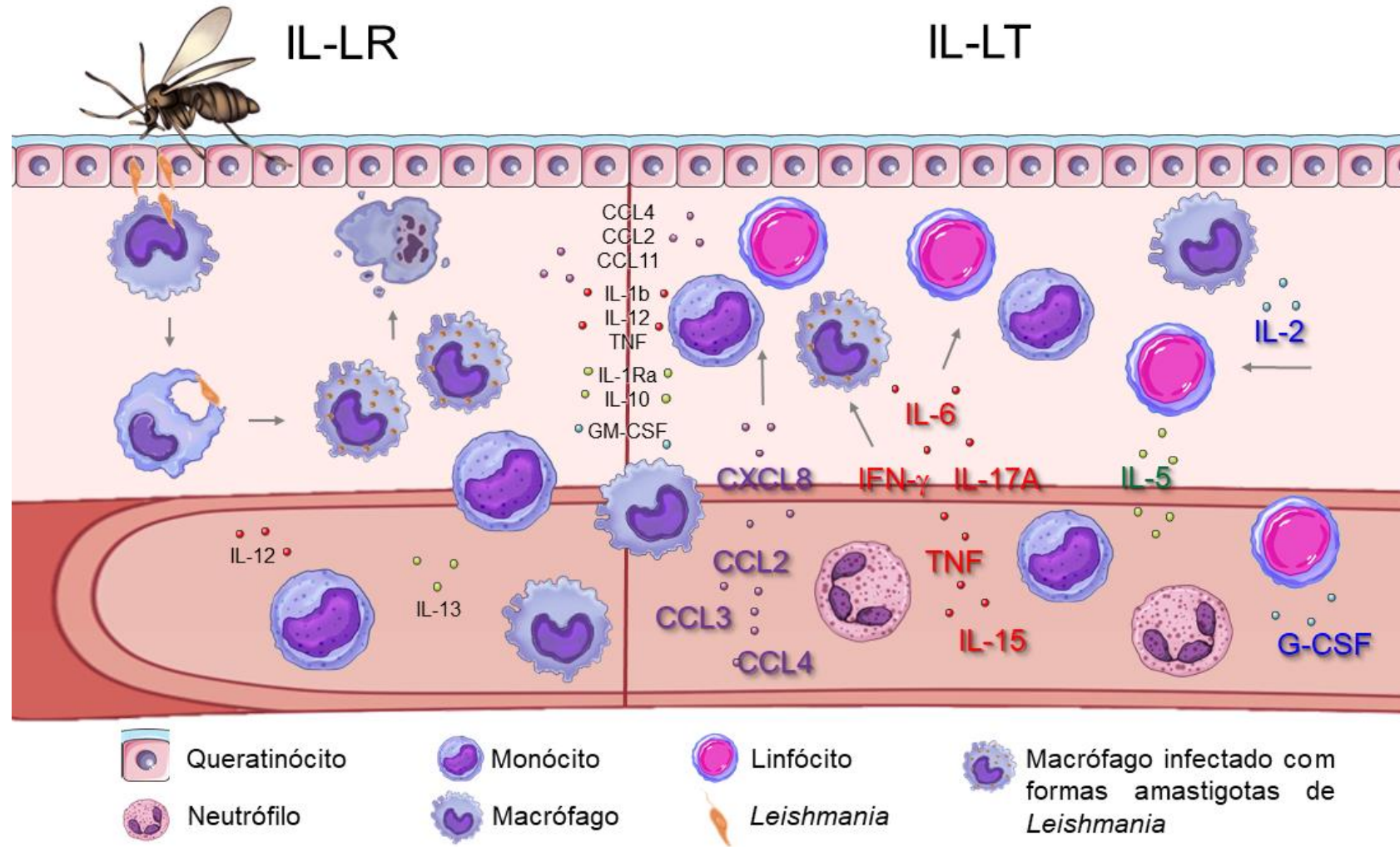
Com isso, foi possível verificar que, ao subdividirmos o grupo em IL-LR e IL-LT, as principais correlações fortes envolvendo os biomarcadores avaliados estava presente no grupo de lesões recentes. Estes pacientes, embora tenham apresentado menor produção de biomarcadores como mencionado nas análises descritivas, apresentaram interessantemente conexões fortes entre eles, especialmente no microambiente da lesão (Figura 13).

Figura 14: Figura representativa das principais diferenças encontradas no perfil de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento circulantes e presentes no microambiente da lesão dos pacientes submetidos ao tratamento com Glucantime® endovenoso (LC-EV) e intralesional (LC-IL).



A presença do parasito nos tecidos faz com que sejam produzidas citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF, IL-12, IL-15 e IL-17A e um intenso infiltrado de células de defesa como macrófagos, linfócitos e monócitos. A resposta inflamatória exacerbada pode gerar destruição dos tecidos. No entanto essa destruição parece ser controlada devido a presença de fatores de crescimento (PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF e IL-2) e algumas citocinas reguladoras (IL-4, IL-5 e IL-9) que estão aumentadas. É possível notar as diferenças no perfil de biomarcadores dos grupos LC-EV e LC-IL. O grupo LC-EV tende a ter um perfil mais modulado com alta produção das citocinas moduladoras IL-10 e IL-1Ra. No sangue, é possível observar uma discreta redução dos níveis de IL-17A. Já no grupo LC-IL é evidente um perfil mais pró-inflamatório, caracterizado pela produção de citocinas IL-1 β e IFN- γ . Também estão presentes em alta concentração as quimiocinas CXCL8 e CXCL10. Nesse tipo de resposta é característico o recrutamento de neutrófilos, monócitos e linfócitos que podem ser responsáveis pela eliminação do parasito. No sangue ocorre elevada produção das quimiocinas CCL2, CCL4 e CXCL10 e da citocina pró-inflamatória IL-1 β que podem contribuir para o recrutamento de células polimorfonucleares. FONTE: Própria autoria.

Figura 15: Figura representativa das principais diferenças encontradas no perfil de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento circulantes e presentes no microambiente da lesão de pacientes selecionados para tratamento com Glucantime® intralesional, classificados por tempo de lesão.



Em lesões recentes o perfil de resposta imune parece não ser bem definido, no entanto é possível notar um discreto aumento das citocinas IL-12 e IL-13 circulantes e da quimiocinas CCL4 no tecido. Já nas lesões tardias, grande parte dos biomarcadores encontram-se aumentados, principalmente no sangue, podendo indicar um intenso tráfego de células para o local da lesão. É visto aumento de CXCL8, IFN- γ , IL-17A e IL-5 nos dois compartimentos. No tecido ocorre intenso aumento da citocina pró-inflamatório IL-6 e do fator de crescimento IL-2, podendo estar associado com recrutamento de células efetoras para o local da lesão. E no sangue pode ser visto aumento das quimiocinas CCL-2, CCL-3 e CCL-4, das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-15 e o fator de crescimento G-CSF, caracterizando um ambiente mais inflamatório. FONTE: Própria autoria.

A úlcera cutânea com bordas elevadas é a apresentação mais comum da LC, com ocorrência em mais de 90% dos pacientes infectados por *L. braziliensis* (SALDANHA, et. al., 2017). Perez-Franco e colaboradores (2016), descrevem o predomínio de lesões ulcerativas em infecções causadas por *L. braziliensis* que é a principal espécie envolvida nos casos de LT no país. Em nossos resultados, todas as lesões apresentaram aspectos típico de úlcera, podendo evidenciar a alta prevalência dessa espécie na região. Além disso, o aspecto característico das lesões pode ter associação com um padrão único de resposta imune.

O tamanho da lesão é uma variável clínica relacionada com o perfil de resposta imune. As lesões apresentadas pelo grupo LC-IL foram pequenas (< 3 cm de diâmetro), seguindo os critérios propostos pelo MS para administração de terapia intralesional com Glucantime®. Oliveira e colaboradores (2003) associam a produção das citocinas TNF e IFN- γ com o tamanho da lesão, podendo predizer o tempo de cura, ou seja, quanto maior a produção dessas citocinas, menor o tamanho da lesão e menor o tempo de cura. É descrito que níveis elevados de IFN- γ induz a regressão no tamanho da lesão (REZVAN, et. al., 2017; HURRELL, et. al., 2015). De fato, nosso estudo demonstra que no grupo LC-IL que apresentam lesões menores (mediana: 208 mm²) possuem elevados níveis de IFN- γ , IL-1 β e outras citocinas pró-inflamatórias em comparação com o grupo LC-EV que possuem lesões ligeiramente maiores (mediana: 210 mm²). Esses achados ficam ainda mais evidentes quando analisamos o grupo NL, que foi o grupo que produziu essas citocinas em menor quantidade e possui a maior mediana de tamanho das lesões (314 mm²).

Outra variável que deve ser levado em consideração na escolha da terapia é a localização da lesão. O MS estabelece que podem ser tratadas de forma intralesional

lesões em qualquer região do corpo, exceto na cabeça e regiões periarticulares. No grupo LC-IL as lesões foram encontradas em todas as partes do corpo, e no grupo LC-EV a maior frequência das lesões foram em membros inferiores. Acreditamos que a localização da lesão pode não ter influenciado no perfil de resposta imune.

O critério de cura da LC consiste nos aspectos clínicos da lesão, com a cicatrização total. No entanto, o processo de cicatrização de lesões é complexo, envolvendo diversos mecanismos imunes. Dessa forma, o MS recomenda a que a terapia intralesional com Glucantime[®] seja administrada em pacientes sem imunossupressão. Como já foi visto a intensa resposta do tipo 1 no grupo LC-IL, esse aspecto pode ser fundamental para a resolução e cicatrização das lesões. Foi visto por Carvalho e colaboradores (2021) que nas infecções causadas por *L. braziliensis*, uma resposta pró-inflamatória leva a cura mais acelerada. Em úlceras de pacientes com IDRM negativo, o processo de cicatrização foi mais lento do que no grupo com resultado positivo. Isso sugere que a deficiência da resposta do tipo 1 pode prejudicar a resolução da infecção.

Certamente, um dos fatores mais importantes a ser considerado no emprego da terapia intralesional é o número de lesões. Em infecção por *L. tropica*, os pacientes com múltiplas lesões apresentaram maiores produções de IFN- γ do que em lesões únicas (Al-QADHI, et. al., 2015). No entanto, em nosso estudo, o inverso foi observado. O grupo de pacientes com mais lesões (LC-EV) apresentou perfil imunológico inflamatório, mas com presença de citocinas moduladoras, com destaque para IL-10 e IL-1Ra. Mais estudos devem ser conduzidos para melhor entender a influência do número de lesões no perfil de resposta imune e resposta ao tratamento.

É amplamente descrito que o tempo de lesão pode influenciar na resposta imune (LLANOS-CUENTAS, et. al., 2008; AMORIM, et. al., 2019). Inicialmente ocorre uma resposta mista tipo 1 e tipo 2 no início da infecção, seguido de uma resposta transitória predominantemente do tipo 2. E com a evolução da infecção, o perfil é alterado novamente para resposta tipo 1 associada à contenção da doença e início do processo cicatricial (UZONNA, et. al., 2004). Al-Qadhi e colaboradores (2015) evidenciaram níveis mais baixos de IFN- γ no estágio inicial da doença, e com a progressão da doença, os níveis aumentam. Nossos dados corroboram esses estudos, uma vez que

mostramos que pacientes do grupo lesão tardia (IL-LT) apresentam resposta inflamatória mais robusta quando comparados aos pacientes do grupo IL-LR.

Em suma, os dados do estudo indicaram algumas diferenças no padrão de biomarcadores apresentados pelos grupos de pacientes tratados com Glucantime® endovenoso e intralesional. O padrão de biomarcadores imunológicos apresentado por pacientes selecionados para tratamento com Glucantime® intralesional, reforça a escolha dos critérios e recomendações preconizados pelo MS, demonstrando que esses pacientes exibem um perfil imunológico muito favorável a boa resposta ao tratamento intralesional.

É importante mencionar três limitações do estudo: a primeira se refere ao tempo de acompanhamento recomendado pelo MS que preconiza 120 dias para avaliação de casos de recidiva. No entanto, é descrito que após o início da terapia, o tempo para reepitelização e cicatrização da lesão é de aproximadamente três meses. Com isso, os pacientes foram acompanhados por 90 dias. Outra limitação é devido a impossibilidade de análise do perfil imunológico após o tratamento e cura a nível sistêmico e principalmente no microambiente da lesão. Não é recomendado gerar traumas, como realização de novas biópsias, em lesões cicatrizadas devido à possibilidade de reativação da lesão. Por fim, a impossibilidade de se inserir no grupo LC-EV, pacientes com diferentes padrões de lesão, como lesões vegetantes ou em placa, e lesões de tamanhos muito variados.

Como perspectivas pretendemos avaliar o perfil de expressão gênica sistêmico e localizado desses mesmos grupos para complementar os dados obtidos no presente trabalho. Ainda pretendemos avaliar o perfil de biomarcadores de um grupo composto por pacientes que tiveram falha terapêutica, e avaliar a influência da microbiota, presente no microambiente da lesão, na resposta imune dos pacientes. Com isso, será possível elaborar um painel de biomarcadores preditivos associado ao tratamento com Glucantime® intralesional.

7. Conclusão

O perfil de biomarcadores imunológicos circulantes e presentes no exsudato inflamatório das lesões cutâneas de pacientes com LCL tratados com Glucantime® intralesional, poderia estar associada a boa resposta ao tratamento e reforça a necessidade dos critérios e recomendações preconizados pelo MS para terapia intralesional. Além disso, os dados indicam que o estudo de medidores imunológicos pode ser uma ferramenta importante para protocolos de recomendação da terapia intralesional que além de reduzir custos para o tratamento, possui baixa toxicidade.

8. Referencias

ADAMS, E. R. et al. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. **Parasitology**, v. 141, n. 14, p. 1891–1897, 2014.

AKHOUNDI, M.; et. al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, p. 1-29, 2017.

ALMEIDA, R. P., et. al. Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, p. 79-81, 2005.

ALMEIRA, R., et. al. Randomized, Double-Blind Study of Stibogluconate Plus Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor versus Stibogluconate Alone in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 1735–7, 1999.

AL-QADHI, B. N.; et. al. Comparative immune study on cutaneous leishmaniasis patients with single and multiple sores. **J Parasit Dis**, v. 39, n. 3, p. 361–370, 2015.

ALVES, M. L. R.; et. al. **Avaliação do perfil fenotípico-funcional de monócitos de pacientes portadores de leishmaniose cutânea localizada, tratados com o antimonio de N-metil glucamina**. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2014.

ALVES, M. L. R; et. al. Fcγ-RI, Fcγ-RII and IL-10 as predictive biomarkers for post-therapeutic cicatrization time in monocytes from Cutaneous Leishmaniasis patients. **Parasite Immunol**, v. 4, n. 8, p. 1-32, 2018.

AMORIM, C. F.; et al. Variable gene expression and parasite load predict treatment outcome in cutaneous leishmaniasis. **Sci Transl Med**, v. 11, n. 519, 2019.

ARONSON, N. E.; JOYA, C. A. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. **Infect Dis Clin N Am**, n. 33, p. 101–117, 2019.

BACELLAR, O., et. al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 200, p. 75-78, 2009.

BACELLAR, O., et. al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect Immun**, v. 70, n. 12, p. 6734-40, 2002.

BAHRAMI, F; HARANDI, A. M; RAFATI, S. Biomarkers of Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.8, n. 222, 2018.

BARRIENTOS, S.; et. al. Perspective article: growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair Regen**, v. 16, p. 585–601, 2008.

BOAVENTURA, V. S., et. al. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. **Eur J Immunol**, v. 40, p. 2830-2836, 2010.

BOURREAU, E., et. al. High Intralesional Interleukin-10 Messenger RNA Expression in Localized Cutaneous Leishmaniasis Is Associated with Unresponsiveness to Treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 12, p. 1628–1630, 2001.

BRAZ, L. M. A. Tegumentary leishmaniasis diagnosis: What happened with MST (Montenegro skin test) in Brazil? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 61, n. 0, p. 1–3, 2019.

BRELAZ, M. C; et. al. Antigenic fractions of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. **Parasite Immunol**, v. 34, p. 236-39, 2012A.

BRELAZ-DE-CASTRO, M. C; et al. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. **Cell Immunol**, v. 279 p. 180-86, 2012B.

BRITO, N.; RABELLO, A.; COTA, G. Efficacy of pentavalent antimoniate intralesional infiltration therapy for cutaneous leishmaniasis: A systematic review. **Plos One**, v. 12, n. 9, p.0184777-0184799, 2017.

CARVALHO, A. M. et. al. Impaired Th1 response is associated therapeutic failure in patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 223, n. 3, p. 527–535, 2021.

CARVALHO, E. M.; et. al. Cell-mediated immunity in American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 135, p. 4144- 4149, 1985.

CASTELLANO, L. R.; et. al., 2009. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. **Hum Immunol** v. 70, p, 383-390, 2009

CONCEIÇÃO, J. et. al. Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, p. 1-19, 2016.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; LEITE-SILVA, J.; MORGADO, F. N. The Binomial Parasite-Host Immunity in the Healing Process and in Reactivation of Human Tegumentary Leishmaniasis. **Frontiers in Microbiology**, v.9, n. 1308, 2018.

COSTA, R. M.; et. al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose- ranging study of granulocyte-macrophage colony stimulating factor in patients with chronic venous leg ulcers. **Wound Repair Regen**, v. 7, n. 1, p. 17-25, 1999.

COSTA-SILVA M. F., et. al. Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis. **Mol Immunol**, v. 57, n. 2, p. 74-85, 2014.

COUTINHO, S. G., et. al. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary Leishmaniasis patients. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 96, n. 1, 2002.

COUTINHO, SG; DA-CRUZ, AM; BERTHO, AL; SANTIAGO, MA; DE-LUCA, P; Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 31, p. 139-142, 1998.

CRUCIANI, M.; et. al. Are granulocyte colony-stimulating factors beneficial in treating diabetic foot infections?: a meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 28, p. 454–60, 2005.

DEGRAVE, W.; et. al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 463-469, 1994.

DINARELLO, C. A.. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, p. 3720–3732, 2011.

DINIZ, A. M. A.; BATELLA, W. B. O Estado De Minas Gerais e suas regiões: Um resgate histórico das principais propostas oficiais de regionalização. **Sociedade e natureza**, v. 17, n. 33, p. 59-77, 2005.

FARIA, D. R., et. al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal Leishmaniasis. **Infect. Immun**, v. 73, p. 7853–7859, 2005.

FERNANDA, O., et. al. Host-Directed Therapies for Cutaneous Leishmaniasis. **Front Immunol**, v. 12, n. 660183, 2021.

FERNANDES, H. J. **Análise da toxicidade relacionada ao uso intralesional de antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea localizada**. 2019. 93f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Saúde, Pós-graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou, Belo Horizonte, 2019.

FERNANDES, H. J.; et. al. Safety profile of meglumine antimoniate intralesional infiltration for cutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 18, n. 4, p. 381-387, 2020.

GARCIA, A. L. et al. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 4, p. 368–371, 2007.

GOMES-SILVA, A., et. al. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection?. **Clin. Exp. Immunol**, v. 149, p. 440–444, 2007.

GOTO, H. LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293–307, 2012.

HANDLER, M, Z. et. al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis - Differential diagnosis, diagnosis, histopathology and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, V. 73, n. 6, p. 911-926, 2015.

HIPPÓLITO, D. D. C.; et. al. Gene expression profile of cytokines produced in biopsies from patients with American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 189, p. 69-75. 2019.

HURRELL, B. P.; et. al. Rapid sequestration of *Leishmania mexicana* by neutrophils contributes to the development of chronic lesion. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 5, 2015.

JAMEEL, R. A; AL-QADHI, B. N. Monitoring of the Immune Response Activity in Iraqi Patients Infected with Cutaneous Leishmaniasis by IFN- γ and MIG Evaluation During Different Stages of Infection. **Iraqi Journal of Science**, v. 61, n. 5, p.970-977, 2020.

Jl J, Masterson J, Sun J, Soong L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. **J Immunol**, v. 174, p. 7147-7153, 2005.

KAMMOUN-REBAI, W, et. al. Protein biomarkers discriminate *Leishmania major*-infected and non-infected individuals in areas endemic for cutaneous leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 138, 2016.

KIMA, P. E.; Soong, L. Interferon gamma in Leishmaniasis. **Front. Immunol**, v. 4, n. 156, 2013.

KIP, A. E., et. al. Systematic Review of Biomarkers To Monitor Therapeutic Response in Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, v. 1, 2015.

KIWANUKA, E., JUNKER, M. D., ERIKSSON, E. Harnessing Growth Factors to Influence Wound Healing. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 39, n. 3, p. 239-248, 2012.

KORN, T., et. al. IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 485-517, 2009.

KRUSCHEWSKY, W. L. L.; FALQUETO, A.; PEÇANHA, P. M. Leishmaniose tegumentar americana disseminada em paciente imunocompetente. **The brazilian journal of infectious diseases**, v. 25, n. 1, 2021.

LIU, L., et. al. Chemokine receptor CXCR3: an unexpected enigma. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 68, p. 149–181, 2005.

LLANOS-CUENTAS, A.; et. al. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. **Clin Infect Dis**, v. 46, p. 223–31, 2008.

LORÍA-CERVERA, E.; ANDRADE-NARVAEZ, F. The role of monocytes/macrophages in Leishmania infection: A glance at the human response. **Acta Tropica**, v. 207, 2020.

LUZ, Z. M. P. et. al. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of Leishmania spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. Mem. **Inst. Oswaldo Cruz**, v.104, n.1, 2009.

MACHADO-PAULO R. L.; Penna-Gerson. Miltefosine and cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 25, p. 141-144, 2021.

MAGALHÃES, A. V. et. al. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis*. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, p. 253–62, 1986.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. L. F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their Control. **Cad. Saúde Públ.** v. 10 (supl. 2), p. 359-375, 1994B.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Proposta de uma classificação clínica simplificada para as leishmanioses tegumentares do novo mundo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, (supl. 1) n. 1, p. 91, 1994A.

MAST, B. A.; SCHULTZ, G. S. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen*, v. 4, n. 4, p. 411-20, 1996.

MEIRA, C. S; Gedamu, L. Protective or Detrimental? Understanding the Role of Host Immunity in Leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 13, n. 7, p. 695, 2019.

MENDES, D. S, et. al. Inflammation in disseminated lesions: an analysis of CD4+, CD20+, CD68+, CD31+ and vW+ cells in nonulcerated lesions of disseminated leishmaniasis. **Memorias Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 18–22, 2013.

MENDONÇA, L. S. O, et. al. Characterization of serum cytokines and circulating microRNAs that are predicted to regulate inflammasome genes in cutaneous leishmaniasis patients. **Experimental Parasitology**, v. 210, n. 107846, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância em Saúde**. 3a ed. Brasília: Ministério da Saúde do Brasil - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Tegumentar (LT)**. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar>. Acesso em: 17 de março de 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Secretaria de Vigilância em saúde. Brasília. 2ed, p. 180. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília. 1ed, p. 91. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota informativa conjunta N° 03/2021** - DIVE/DIAF/DLOG. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar>. Acesso em: 12 de julho de 2022.

MONTENEGRO, J. CUTANEOUS REACTION IN LEISHMANIASIS. **Archives of Dermatology**, v. 13, n. 2, p. 187, 1926.

MONTOYA, A. et. al. Transforming Growth Factor Beta (TGFb1) and Epidermal Growth Factor (EGF) as Biomarkers of *Leishmania (V) braziliensis* Infection and Early Therapeutic Response in Cutaneous Leishmaniasis: Studies in Hamsters. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. 350, 2018.

NAVAS, A., et. al. Profiles of Local and Systemic Inflammation in the Outcome of Treatment of Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia)*. **Infection and Immunity**, v. 88, n. 3, 2020.

NOVAIS, F.O., et. al. CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 β production. **PLoS Pathog**, v. 13, 2017.

NOVOA, R., et. al. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. **Parasite Immunol**, v. 33, p. 132-136, 2011.

OGHUMU S.; et. al. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. **Exp Parasitol**, v. 126, p. 389–396, 2010.

OLIVEIRA, L. F. B. **Avaliação de marcadores clínicos e imunológicos associados ao prognóstico da evolução clínica e da resposta terapêutica na Leishmaniose Cutânea Localizada**. 2003. 100 f. Dissertação (Mestrado) - curso de patologia experimental, curso de pós -graduação em patologia, centro de pesquisas gonçalo moniz, salvador, 2003.

OLIVEIRA, F., et. al. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 85, n. 1, p. 70-3, 2011.

OPAS. Leishmanioses: Informe Epidemiológico Das Américas, n. 10, 2021. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386> . Acesso em:19/06/22.

OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**, v. 28, p. 454-467, 2008.

PALMEIRO, M. R., et. al. Comparative study of the in situ immune response in oral and nasal mucosal Leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 34, p. 23–31, 2012.

PENICHE, A. G., et. al. A secondary wave of neutrophil infiltration causes necrosis and ulceration in lesions of experimental American cutaneous leishmaniasis, **PloS One**, v. 12, p. 1–20, 2017.

- PEREZ-FRANCO, J. E.; et. al. Clinical and Parasitological Features of Patients with American Cutaneous Leishmaniasis that Did Not Respond to Treatment with Meglumine Antimoniate. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 5, 2016.
- PEREZ-FRANCO, J.; et. al. Clinical and Parasitological Features of Patients with American Cutaneous Leishmaniasis that Did Not Respond to Treatment with Meglumine Antimoniate. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, p. 1-13, 2016.
- PIRES, A. M. S; et. al. Aspectos imunológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: uma revisão. **Rev. Ciênc. Saúde, São Luís**, v.14, n.1, p. 30-39, 2012.
- PIRMEZ, C.; et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 4, p. 1.390-1.395, 1993.
- QUARESMA, p. f., et. al. Distinct genetic profiles of *Leishmania (Viannia) braziliensis* associate with clinical variations in cutaneous-leishmaniasis patients from an endemic area in Brazil. **Parasitology**, v. 12, p. 1-9, 2018.
- RAJA, K. et. al. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. **Front Biosci**, v. 1, n. 12, p. 2849-68, 2007.
- RAMALHO, D. B.; et. al. Meglumine antimoniate intralesional infiltration for localised cutaneous leishmaniasis: a single arm, open label, phase II clinical trial. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 9, 2018.
- RATH, S.; et. al. Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: the state of the art. **Quim. Nova**, v. 26, n.4, p. 550-555, 2003.
- REGLI, I. B; et. al. Survival Mechanisms Used by Some *Leishmania* Species to escape neutrophil Killing. **Frontiers in Immunology**, v, 8, n.1558, 2017.
- REIS, L. C. et. al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de patologia tropical**, v. 35, n. 2, p. 103-115, 2006.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. **J Clin Microbiol**, V. 45, n, 1, p. 21–25, 2007.
- REZVAN, M. M. H.; et. al. Comparison of pro-inflammatory cytokines of non healing and healing cutaneous leishmaniasis. **Scand J Immunol**, v. 85, n. 4, p. 291 299, 2017.
- ROBSON. M. C. Growth factors as wound healing agents. **Curr Opin Biotechnol**, v. 2, n. 6, p. 863-7, 1991.
- ROSS, R. Note on the bodies recently described by leishman and donovan, **Br. Med. J**, v. 2, p. 1261–1262, 1903.

SALDANHA, M. G.; et. al. Characterization of the Histopathologic Features in Patients in the Early and Late Phases of Cutaneous Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 96, n. 3, p. 645–652, 2017.

SANTOS, J. B., et. al. Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous Leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **J Infect Dis**, v. 190, p. 1793-1796, 2004.

SCHAERLI, P.; et. al. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. **J Exp Med**, n. 192, p. 1553–1562, 2000.

SCHRIEFER, A.; et. al. Recent Developments Leading Toward a Paradigm Switch in the Diagnostic and Therapeutic Approach to Human Leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis*, v. 21, n. 5, p. 483–488, 2008.

SILVA, R. E. **Validação da técnica de infiltração intralesional de antimoniato de meglumina para tratamento de leishmaniose cutânea**. 2019. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Saúde, Pós Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou, Belo Horizonte, 2019.

SILVA, R. E.; et. al. Intralesional meglumine antimoniate for the treatment of localised cutaneous leishmaniasis: a retrospective review of a Brazilian referral centre. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 8, p. 512-516, 2016.

Sinan/SVS/MS - SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE / MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Casos de leishmaniose tegumentar**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/arquivos/lt-casos.pdf>. Acesso em: 27/10/22.

SINGH, N. D. resistance mechanisms in clinical isolates of Leishmania donovani. **Indian J Med Res**, v. 123, p. 411-422, 2006.

TAYLOR, R.; et. al. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. **Journal of Diagnostic Medical Sonography**, v. 6, n. 1, 1990.

TUON, F. F. et al. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis - a systematic review with a meta-analysis. **International Journal of Dermatology**, v. 47, n. 2, p.109-124, 2008.

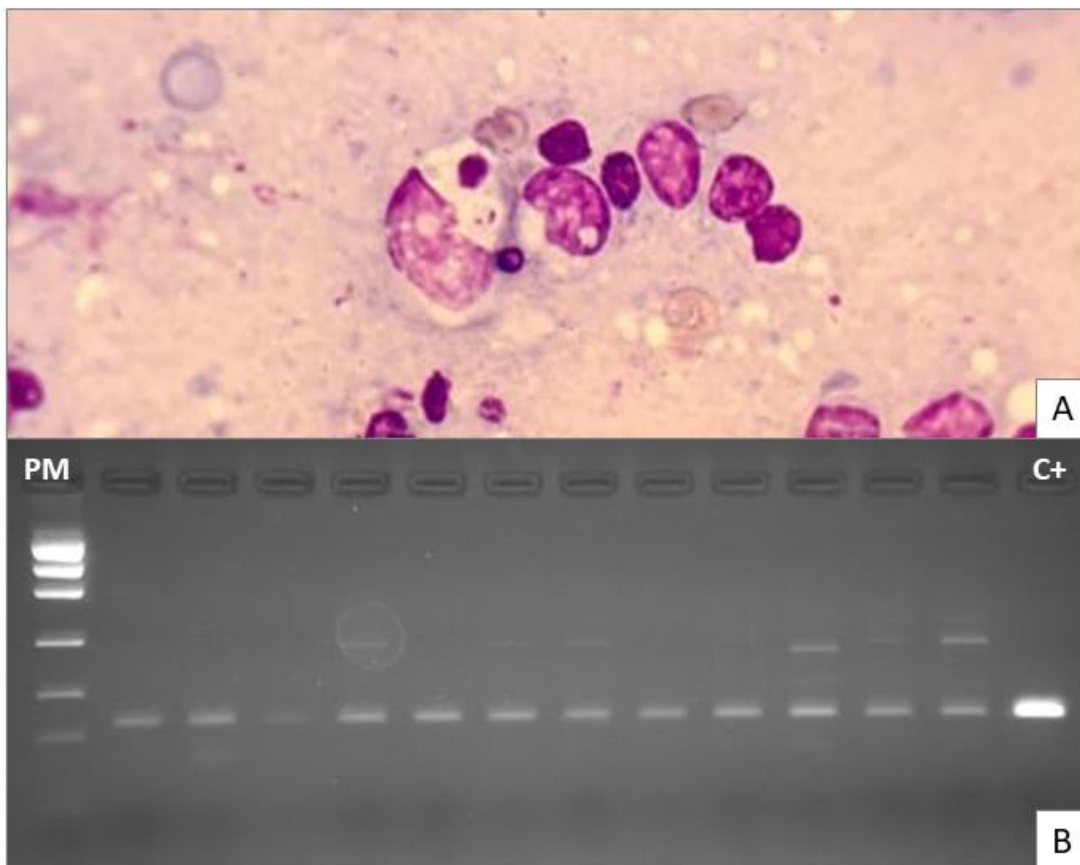
TURETZ, M. L.; et. al. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 12, p. 1829–1834, 2002.

UZONNA, J. E.; et. al. Vaccination with phosphoglycan-deficient Leishmania major protects highly susceptible mice from virulent challenge without inducing a strong Th1 response. **J Immunol**, n. 172, p. 3793–3797, 2004.

- VANZANDBERGEN, G. V.; et. al. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. **J Immunol**, v. 173, n. 11, p. 6521-6525, 2004.
- VARGAS, D. A; et. al. Pharmacometabolomics of Meglumine Antimoniate in Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.
- VASCONCELOS, J. M. et. al. American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, p. 221-7, 2018.
- VASQUEZ, R. E; SOONG, L.. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. **Infect Immun**, v. 74, n. 12, p. 6769-77, 2006.
- VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de leishmania (nota preliminar). **Brasil Médico**, n. 41, 1911.
- VOLPEDO, G, et. al. Mechanisms of Immunopathogenesis in Cutaneous Leishmaniasis and Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). **Front Cell Infect Microbiol**, v. 11, n. 685296, 2021.
- VRIES, H. J. C; REEDIJK, S. H; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **Am J Clin Dermatol**, V. 16, N. 2, P. 99-109, 2015.
- WEIGLE, K.; SARAVIA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. **Clin Dermatology**, v, 14, p. 433-450, 1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION/ORIGNIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE.
Leishmaniasis - Epidemiological situation. Disponível em:
<https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf>. Acesso em 29 de maio de 2022.
- WORTMANN, G.; et. al. Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, p. 999-1004, 2005.
- WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L; FAIRLAMB, A. H. Dual Action of Antimonial Drugs on Thiol Redox Metabolism in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. **Metabolism and bioenergetics**, v. 279, p. 39925-39932, 2004.
- ZHENG, J., et. al. Expression of basic fibroblast growth factor, endothelial mitogenic activity, and angiotensin II Type-1 receptors in the ovine placenta during the third trimester of pregnancy. **Biol. Rep.**, v.56, p.1189-1197, 1997.

9. Apêndice

Apêndice1: Diagnóstico parasitológico e molecular de LC.



A- Análise microscópica do *imprint* do fragmento de biópsia da lesão corado por Hematoxilina-Eosina. Pode ser visualizado formas amastigotas de leishmania internalizados por macrófago. **B-** Visualização do gel de agarose (2.0%) corado com brometo de etídeo para diagnóstico de Leishmaniose, tendo como alvo molecular o minicírculo do kDNA de *Leishmania* gerando um fragmento de 120pb. PM: peso molecular. C+: controle positivo. A bandas de 2 a 13 representam os resultados dos pacientes.

Apêndice 2 – Características demográficas da população de estudo

ID	Resultado	Município	Tratamento	Gênero	Idade	Raça	Peso (kg)	Altura (m)	IMC	Comorbidade	Localização da lesão	Tamanho da lesão (cm)		Uso de medicamento	Tempo da ferida (meses)	Aspecto	Número de lesões ativas
41	P	São Jeronimo	EV	F	48	Pardo	74,0	1,61	28,5	Tuberculose	Membros superiores	0,6	0,9	Não	4	Ulcerada	2
44	P	Lajinha	EV	M	54	Preto	64,5	1,70	22,3	N/A	Membros superiores	1,5	1,2	Não	3	Ulcerada	2
48	P	Cedro	EV	F	62	Preto	50,3	1,51	22,1	Hipertensão	Membros inferiores	1,6	1,5	Anti-hipertensivo	4	Ulcerada	3
54	P	Cidade Alta	EV	F	60	Pardo	81,8	1,56	33,6	Hipertensão	Membros superiores			Anti-hipertensivo	4	Ulcerada	2
58	P	Cedro	EV	M	53	Preto	71,5	1,58	28,6	N/A	Membros inferiores	2,2	1,2	Antipsicótico	4	ulcerada	≤20
95	P	São Jeronimo	EV	M	54	Branco	89,0	1,75	29,1	Hipertensão; Diabetes; Alcoolismo	Membros inferiores	8,0	5,0	Anti-hipertensivo; diabetes	1	Ulcerada	1
119	P	Ataleia	EV	F	84	Pardo	55,2	1,52	23,9	Depressão	Membros inferiores	1,6	1,6	Antidepressivo	3	Ulcerada	1
122	P	Carai	EV	M	18	Pardo	45,9	1,66	16,7	N/A	Membros inferiores	1,9	1,5	Não	2	Ulcerada	≤20
123	P	Poté	EV	M	44	Preto	77,0	1,66	27,9	N/A	Membros inferiores	1,5	1,1	Não	3	Ulcerada	1
162	P	Poté	EV	F	64	Preto	50,0	1,45	23,8	N/A	Membros inferiores	1,6	1,1	Não	2	Ulcerada	1
40	P	Topazio	IL	F	29	Preto	73,0	1,41	36,7	N/A	Membros inferiores	1,2	2,5	Não	1	Ulcerada	1
42	P	Vila Barreiros	IL	F	61	Pardo	137,0	1,57	55,6	Hipertensão	Membros inferiores	3,3	3,4	Anti-hipertensivo	12	Ulcerada	1
45	P	Pindorama	IL	M	50	Branco	85,4	1,67	30,6	N/A	Tronco	4,7	3,7	Não	3	Ulcerada	1

46	P	Cidade Alta	IL	M	35	Branco	107,5	1,77	34,3	N/A	Membros inferiores	3,5	1,5	Antibiótico e anti-inflamatório	2	Ulcerada	1
47	P	Castro Pires	IL	F	78	Pardo	68,5	1,58	27,4	Hipertensão; Diabetes; Varizes	Membros inferiores	2,0	1,3	Anti-hipertensivo e diabetes	2	ulcerada	1
49	P	Cedro	IL	F	57	Branco	69,8	1,63	26,3	N/A	Membros inferiores	6,0	4,3	Não	5	Ulcerada	1
52	P	Funcionários	IL	M	82	Branco	99,0	1,70	34,3	Hipertensão	Membros inferiores	2,6	4,6	Não	3	Ulcerada	1
55	P	Vila São Joao	IL	F	49	Preto	97,0	1,55	40,4	Varizes	Membros superiores	2,0	1,4	Não	4	Ulcerada	1
56	P	Lajinha	IL	M	47	Branco	89,0	1,83	26,6	Hipertensão	Membros inferiores	1,1	0,9	Anti-hipertensivo e ansiolítico	6	Ulcerada	1
57	P	Cedro	IL	M	19	Preto	51,0	1,56	21,0	N/A	Membros inferiores	3,1	2,5	Não	3	ulcerada	1
59	P	Mucuri	IL	M	61	Pardo	72,0	1,7	24,9	Alcoolismo	Membros superiores	1,6	1,3	Não	2	Ulcerada	1
62	P	Jardim Acacias	IL	F	64	Pardo	47,0	1,32	27,0	N/A	Membros superiores			Antidepressivo	1	ulcerada	1
63	P	Vila Ramos	IL	F	67	Preto	69,0	1,53	29,5	Hipertensão; Diabetes	Membros superiores	2,8	2,2	Anti-hipertensivo e diabetes	2	ulcerada	1
80	P	Pindorama	IL	F	39	Preto	93,0	1,63	35,0	N/A	Membros superiores			Não	2	ulcerada	1
97	P	Manoel Pimenta	IL	M	23	Pardo	66,0	1,84	19,5	Tabagismo; Alcoolismo	Membros superiores	1,5	1,0	Antidepressivo	3	Ulcerada	1
101	P	Jardim Acacias	IL	F	42	Pardo	79,2	1,45	37,7	Hipertensão	Membros superiores	0,8	0,7	Anti-hipertensivo; antidepressivo; antipsicótico	3	Ulcerada	1
117	P	Manoel Pimenta	IL	F	44	Preto	96,0	1,62	36,6	Hipertensão	Membros inferiores	0,6	0,5	Anti-hipertensivo	2	Ulcerada	1
121	P	Catuji	IL	M	18	Pardo	64,5	1,77	20,6	N/A	Membros superiores	1,3	0,8	Não	1	Ulcerada	1
127	P	Topazio	IL	F	49	Preto	87,5	1,71	29,9	Tabagismo	Membros inferiores	1,9	1,8	Antiácido	12	Ulcerada	1

144	P	Mucuri	IL	F	18	Preto	45,0	1,65	16,5	N/A	Tronco	0,7	0,7	Não	2	Ulcerada	1
151	P	Palmeiras	IL	M	37	Preto	99,0	1,74	32,7	Alcolismo	Membros superiores	1,6	1,1	Não	3	Ulcerada	1
153	P	São Jeronimo	IL	M	14	Preto	63,0	1,69	22,1	N/A	Membros inferiores	1,2	0,8	Não	2	Ulcerada	1
155	P	Vila São Joao	IL	M	21	Pardo	80,0	1,73	26,7	N/A	Membros superiores	1,0	0,9	Não	2	Ulcerada	1
159	P	Topazio	IL	M	53	Pardo	73,4	1,68	26,0	N/A	Membros superiores	1,0	0,7	Não	3	Ulcerada	1
163	P	São Jeronimo	IL	M	54	Preto	64,8	1,64	24,1	Hipertensão	Membros inferiores	2,0	1,2	Anti-hipertensivo	4	Ulcerada	1
94	N	Cidade Alta	N/A	M	52	Preto	76,0	1,59	30,1	N/A	Membros inferiores	8,0	5,3	Não	24	Ulcerada	1
96	N	Fatima	N/A	F	75	Branco	68,0	1,54	28,7	Hipertensão; Diabetes	Membros inferiores	2,4	1,8	Anti-hipertensivo	7	Ulcerada	1
100	N	Matinha	N/A	M	62	Preto	100,0	1,72	33,8	N/A	Membros superiores			Não			1
103	N	Grão Para	N/A	F	91	Branco	56,0	1,56	23,0	Hipertensão	Membros inferiores	3,1	3,4	Anti-hipertensivo	3	Ulcerada	1
118	N	Manoel Pimenta	N/A	F	84	Pardo	60,8	1,53	26,0	Hipertensão; Diabetes	Membros inferiores	0,6	0,4	Não	1	Ulcerada	2
126	N	Novo Horizonte	N/A	F	76	Preto	58,0	1,49	26,1	Hipertensão; Varizes	Membros inferiores	1,4	1,4	Anti-hipertensivo	1	Ulcerada	1
143	N	Mucuri	N/A	M	62	Preto	66,6	1,66	24,2	N/A	Tornozelo esquerdo	3,0	2,3	Não	14	Ulcerada	1
146	N	Pedro Versiani	N/A	F	67	Pardo	68,0	1,66	24,7	Hipertensão	Membros inferiores	1,1	0,8	Anti-hipertensivo	4	Ulcerada	1
147	N	Carlos Chagas	N/A	M	59	Branco	106,0	1,79	33,1	Hipertensão	Membros inferiores			Anti-hipertensivo	1	Ulcerada	1
148	N	Zilda Maria Ramos	N/A	F	31	Pardo	80,0	1,6	31,3	N/A	Membros inferiores	1,4	1,1	Não	1	Ulcerada	2
150	N	Cedro	N/A	M	66	Preto	71,0	1,65	26,1	Hipertensão	Membros inferiores	3,0	2,6	Anti-hipertensivo	5	Ulcerada	1
164	N	Alto São Jacinto	N/A	M	69	Branco	68,5	1,62	26,1	Hipertensão; Tabagismo	Membros inferiores	2,8	3,1	Anti-hipertensivo	4	Ulcerada	1
165	N	Frei Gaspar	N/A	M	35	Preto	67,0	1,76	21,6	Diabetes; tabagismo	Membros inferiores	0,8	0,6	Insulina	6	Ulcerada	≤20

166	N	Castro Pires	N/A	F	69	Pardo	50,0	1,45	23,8	Hipertensão; diabetes	Membros inferiores	5,2	2,8	Anti- hipertensivo; Diabetes	6	Ulcerada	1
-----	---	--------------	-----	---	----	-------	------	------	------	--------------------------	-----------------------	-----	-----	------------------------------------	---	----------	---

ID – Identificação

IMC – Índice de massa corporal

P – Positivo

N – Negativo

EV – Endovenoso

IL – Intralesional

F – Feminino

M – Masculino

N/A – Não se aplica

10. Anexos

Anexo 1: Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa “Leishmanioses humanas nos vales Jequitinhonha e Mucuri, Minas Gerais: novas estratégias diagnósticas, prognósticas e de gestão em saúde” porque seu médico acha que voce está com leishmaniose.

Esse documento contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estaremos realizando. Leia atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo a você e não interferirá no seu atendimento e no seu tratamento médico da leishmaniose.

Esta pesquisa estudará novos métodos para o diagnóstico das leishmanioses e o papel de células e moléculas de defesa do organismo, importantes na defesa contra micróbios que causam doença, como as leishmanioses.

A sua participação nesta pesquisa consistirá em:

- 1- Permitir coleta de fragmento de biópsia da lesão cutânea (para paciente com leishmaniose cutânea) por profissional médico especializado ou;
- 2- Permitir coleta de fragmento de biópsia da lesão mucosa (para paciente com leishmaniose mucosa) por profissional médico especializado ou;
- 3- Permitir coleta de aspirado de medula óssea (para paciente com leishmaniose visceral) por profissional médico especializado ou;
- 4- Permitir coleta de sangue que será coletado por punção venosa realizada por profissionais técnicos devidamente treinados no procedimento de coleta (para paciente com leishmaniose mucosa ou leishmaniose visceral).

As amostras biológicas obtidas, serão armazenadas, em freezer a menos 80°C e ficarão na responsabilidade da pesquisadora principal, Dra. Celia Gontijo, e de seus colaboradores da FIOCRUZ Minas. As amostras serão utilizadas para a realização da pesquisa e o que sobrar permanecerá guardado para estudos complementares ou outros estudos que se fizerem necessários no futuro.

Os riscos relacionados com a sua participação na pesquisa são:

Os procedimentos médicos (biópsia caso tenha leishmaniose cutânea ou mucosa; e aspirado de medula óssea caso tenha leishmaniose visceral) serão de responsabilidade de profissional médico capacitado e experiente que te acompanhará ao longo do diagnóstico e tratamento. Os procedimentos serão realizados nos ambulatórios dos serviços de saúde após anestesia, com material cirúrgico adequado e seguindo protocolos padronizados. Para coleta de exsudato inflamatório empregando swab e escova citológica (caso tenha leishmaniose cutânea ou mucosa), todo material será estéril.

Rubrica do pesquisador

Rubrica do participante

Por se tratar de trabalho envolvendo também coleta de sangue (caso tenha leishmaniose mucosa ou visceral), poderá ocorrer dor e manchas vermelhas nos locais da punção. Mas, como a coleta será feita por profissionais bem treinados, esses riscos serão pequenos.

Os benefícios relacionados com a sua participação na pesquisa são:

Ao final do projeto, esse proporcionará uma melhoria significativa no atendimento e acompanhamento clínico-laboratorial de todos os pacientes com leishmanioses antes e após tratamento específico nas regiões onde o projeto atuará.

Você não receberá dinheiro para participar da pesquisa. Caso aconteça algum dano relacionado a pesquisa, você será indenizado.

Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo. Todos os esforços serão empreendidos para evitar esse risco, incluindo codificação do nome e a divulgação dos resultados em jornais e revistas científicas, desde que os seus dados pessoais não sejam mencionados.

Você poderá consultar a pesquisadora responsável ou o Comitê de Ética nos endereços indicados abaixo sempre que entender necessário obter informações ou esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa.

DECLARAÇÃO

Declaro que obtive todas as informações necessárias e esclarecimento quanto às dúvidas por mim apresentadas e, por estar de acordo, assino o presente documento em duas vias de igual teor (conteúdo) e forma, ficando uma em minha posse.

Sujeito da Pesquisa (maior de 18 anos de idade)

Telefone para contato: _____

Assinatura do Pesquisador Principal

Célia Maria Ferreira Gontijo

Endereço e telefone institucional do Pesquisador Principal – IRR/FIOCRUZ/Minas:

Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (CEP: 30190-009)

Pesquisador Principal: Célia Maria Ferreira Gontijo – Telefone: (31) 3349-7755

e-mail: gontijo@minas.fiocruz.br

Endereço e telefone institucional do Comitê de Ética – IRR/FIOCRUZ/Minas:

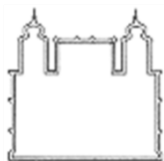
Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (CEP: 30190-009)

Secretária: Bernadete Patrícia Santos – TeleFax: (31) 3349-7825

e-mail: bernadetet@minas.fiocruz.br

Rubrica do pesquisador

Rubrica do participante

Anexo 2: Ficha clínica

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

ANEXO 2**FICHA CLÍNICA DE ACOLHIMENTO DO PACIENTE****Teófilo Otoni, Minas Gerais**

Data do exame: ____/____/____ Médico Responsável: _____

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:**1. Identificação (ID):** _____**Nome completo:** _____**2. Endereço completo:** _____**3. Telefone/Contato:** _____**4. Idade:** _____**5. Sexo:** () Masculino () Feminino**6. Peso:** _____ Kg**7. Altura:** _____ cm**8. Profissão:** Ocupação principal: _____

Ocupação secundária (caso possua): _____

ANAMNESE:**9. Doenças identificadas no exame clínico ou citadas pelo paciente:**

9.1 () Tuberculose

9.2 () Doença de Chagas

9.3 () Doença venérea

9.4 () Pneumonia

9.5 () Hipertensão arterial

9.6 () Diabetes

9.7 () Varizes dos membros inferiores

9.8 () Tabagismo

9.9 () Alcoolismo (se bebe mais de 2x na semana)

9.10 () Doença autoimune. Qual? _____

9.11 Outra: _____

9.12 () Não apresenta ou relata doenças

10. Sinais e sintomas relatados pelo paciente:

Sinais e sintomas	Há quanto tempo	Melhora com
10.1 () Artralgia		
10.2 () Mialgia		
10.3 () Inapetência		
10.4 () Náuseas		
10.5 () Vômitos		
10.6 () Plenitude gástrica		
10.7 () Epigastralgia		
10.8 () Pirose		
10.9 () Dor abdominal		
10.10 () Prurido		
10.11 () Febre _____°C		
10.12 () Fraqueza/ Cansaço		
10.13 () Cefaléia		
10.14 () Tontura		
10.15 () Palpitação		
10.16 () Insônia		
10.17 () Nervosismo		
10.18 () Choque Pirogênico		
10.19 () Edema		
10.20 () Insuficiência renal aguda		
10.21 () Dor no peito		

Exame clínico:

Temperatura axial: _____°C

Pressão arterial: _____ mmHg

FC _____

FP _____

FR _____

Cabeça:

Orofaringe () Normal () Alterado Especificar: _____

Nariz/cav. nasal () Normal () Alterado Especificar: _____

Pescoço () Normal () Alterado Especificar: _____

Tórax:

Axila: linfonodo () Normal () Alterado Especificar: _____

Ap. respiratório () Normal () Alterado Especificar: _____

Cardio-vascular () Normal () Alterado Especificar: _____

Abdome

Fígado () Normal () Alterado Especificar: _____
 Baço () Normal () Alterado Especificar: _____

Outros

Força muscular () Normal () Alterado Especificar: _____
 Osso/articulação () Normal () Alterado Especificar: _____
 Pele () Normal () Alterado Especificar: _____

11. O Sr(a) está usando algum medicamento de uso contínuo?

() Não () Sim () Para que? _____

12. Verificar a presença de acometimento linfático (mesmo sem a presença de lesões).

12.1 Ganglios: () Não () Sim

12.2 Local: _____

12.3 Tamanho: _____ cm

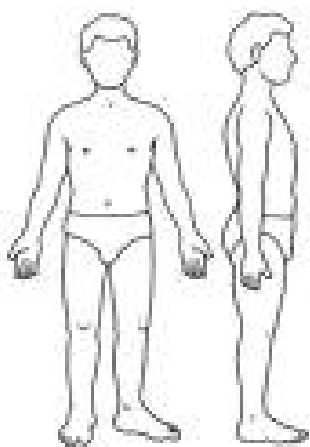
12.4 Linfangite: () Não () Sim

12.5 Local: _____

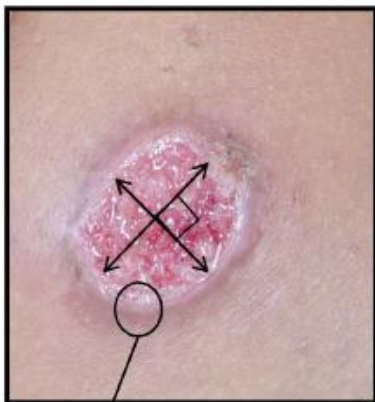
13. O Sr(a) tem alguma ferida ativa?

() Não () Sim

Assinale na figura:



, aspecto e tamanho das lesões ativas (maior diâmetro em cm de **NFORME A FIGURA ABAIXO.**



Local	Nº	Diam.	Aspecto
Cabeça/pescoço		___,___	() Úlcera () Pápula () Nódulo () Placa () Lesão vegetante () Lesão verrucosa
Tronco		___,___	() Úlcera () Pápula () Nódulo () Placa () Lesão vegetante () Lesão verrucosa
Abdome		___,___	() Úlcera () Pápula () Nódulo () Placa () Lesão vegetante () Lesão verrucosa
Antebraço		___,___	() Úlcera () Pápula () Nódulo () Placa () Lesão vegetante () Lesão verrucosa
Braço		___,___	() Úlcera () Pápula () Nódulo () Placa () Lesão vegetante () Lesão verrucosa
Mão		___,___	() Úlcera () Pápula () Nódulo () Placa () Lesão vegetante () Lesão verrucosa
Coxa		___,___	() Úlcera () Pápula () Nódulo () Placa () Lesão vegetante () Lesão verrucosa ()
Tíbia		___,___	() Úlcera () Pápula () Nódulo () Placa () Lesão vegetante () Lesão verrucosa
Pés		___,___	() Úlcera () Pápula () Nódulo () Placa () Lesão vegetante () Lesão verrucosa

15. Número total de **LESÕES ATIVAS**: _____

16. Há quanto tempo o Sr(a) está com essa ferida? Aprox. _____ meses

17. Onde o Sr(a) acha que pegou essa ferida?

() Casa () Mata () Outro _____

18. Como apareceu essa ferida? (Anotar o histórico do aparecimento da lesão. Quando apareceu a primeira ferida. Se fez tratamento para leishmaniose. Se a ferida fechou. Se apareceram outras, quando, etc).

19. O Sr(a) foi ao médico para avaliação da lesão? () Não () Sim

APENAS SE “SIM” NA QUESTÃO ANTERIOR

19.1 O que o médico disse? _____

19.2. O médico receitou algum medicamento?

() Não

() Sim, qual? _____

Anotar a formulação (tópico, injetável, comprimido e etc.) e classe do medicamento (antibiótico, anti-inflamatório e etc)

() Não sabe

19.3. Fez o tratamento completo indicado pelo médico?

() Não. Porque? _____

() Sim

() Não sabe

() Ainda está em tratamento

APENAS SE “AINDA ESTIVER EM TRATAMENTO”

19.3.1 Quando iniciou o tratamento?

() < de 1 mês () 1-3 meses () 4-6 meses () mais de 6 meses

19.3.2 Observa alguma melhora significativa?

() Não () Sim () Não sabe

19.4 Há quanto tempo encerrou o tratamento? _____ meses

19.5. Retornou ao médico para nova avaliação?

() Não () Sim. O que o médico disse? _____

20. O Sr(a) está tratando com algum remédio caseiro?

() Não () Sim, qual? _____

APENAS SE “SIM” NA QUESTÃO ANTERIOR

20.1 Você acha que melhorou?

() Não () Sim () Parcialmente () Não sabe

21. A lesão está: (Se necessário marcar mais de uma opção)

21.1 () Ativa, ulcerada

21.2 () Parcialmente epitelizada

21.3 () Epitelizada com bordas infiltradas e/ou descamativas

21.4 () Ativa em placa

APENAS SE APRESENTAR MAIS DE UMA LESÃO ATIVA

22. Todas as lesões apareceram ao mesmo tempo? () Sim () Não

23. Há quanto tempo apareceram as outras lesões? _____ meses () Não sabe

24. As outras lesões estão: (Se necessário marcar mais de uma opção)

24.1 () Ativa, ulcerada

24.2 () Parcialmente epitelizada

24.3 () Epitelizada com bordas infiltradas e/ou descamativas

24.4 () Ativa em placa

25. O Sr(a) tem alguma cicatriz? () Não () Sim

26. Qual a origem da cicatriz? _____

27. Local da cicatriz:

() Cabeça/ pescoço

() Mão

() Tronco

() Coxa

() Abdome

() Tíbia

() Antebraço

() Pés

() Braço

() Joelho

28. Há quanto tempo o Sr(a) tem essa cicatriz? _____ meses

29. O Sr(a) tratou a ferida? () Não () Sim, com o que? _____

30. O tratamento foi recomendado por algum médico? () Não () Sim

APENAS SE “SIM” NA QUESTÃO ANTERIOR

30.1 Fez o tratamento completo? () Não () Sim () Não aplicável

APENAS SE “NÃO” NA QUESTÃO ANTERIOR

30.2. Por que o Sr(a) abandonou o tratamento?

- Melhora clínica Falta de medicamento Dificuldade de acesso
 Outro: _____

APENAS SE “SIM” NA QUESTÃO ANTERIOR

30.3. E o que o médico disse?

- Que estava curado Não curou Não sabe
 Outro: _____

31. O Sr(a) utilizou algum remédio caseiro? Sim Não

APENAS SE “SIM” NA QUESTÃO ANTERIOR

31.1 Qual? _____

31.2 Você acha que melhorou?

- Não Sim Parcialmente Não sabe

CONCLUSÃO DO DIAGNÓSTICO CLÍNICO ATUAL:

- Quadro primário (Caso Novo, ou seja, ainda não tratado)
 Recidiva (Lesão no mesmo local da lesão anterior)
 Reinfecção (Apresenta cicatriz SUGESTIVA e lesão em outro local)
 Curado (cicatriz totalmente epitelizada)
 Não é caso clínico de LTA
 Indefinido. Justifique: _____
-

Enfermeiro responsável

Médico responsável