UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
DOUTORADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS

ESTUDO DE EFICÁCIA E EFETIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO MILTEFOSINA E FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS E MACRÓFAGOS-GM-CSF NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania guyanensis* NA REGIÃO DE MANAUS, AMAZONAS

LUCIANA MENDES DOS SANTOS

MANAUS

2020

LUCIANA MENDES DOS SANTOS

ESTUDO DE EFICÁCIA E EFETIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO MILTEFOSINA E FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS E MACRÓFAGOS-GM-CSF NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania guyanensis* NA REGIÃO DE MANAUS, AMAZONAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção grau de *Doutor em Doenças Tropicais e Infecciosas.*

Orientador: **Prof°** Jorge Augusto de Oliveira Guerra

Co-orientador: **Prof°** Edgar Marcelino de Carvalho Filho

MANAUS

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

S237e Santos, Luciana Mendes dos
Estudo de eficácia e efetividade da associação miltefosina e fator estimulador de granulócitos e macrófagos GM-CSF no tratamento da leishmaniose cutânea causada por Leishmania guyanensis na região de Manaus, Amazonas / Luciana Mendes dos Santos. Manaus : [s.n], 2020.
111 f.: color.; 28 cm.

Tese - Pós-graduação em Medicina Tropical- Doutorado em Doenças Tropicais e Infecciosas - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2020.
Inclui bibliografia
Orientador: Jorge Augusto de Oliveira Guerra
Coorientador: Edgar Marcelino de Carvalho Filho

1. Miltefosina. 2. Leishmaniose Cutânea. 3. Tratamento. 4. Imunomodulador. 5. GM-CSF. I. Jorge Augusto de Oliveira Guerra (Orient.). II. Edgar Marcelino de Carvalho Filho (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Estudo de eficácia e efetividade da associação miltefosina e fator estimulador de granulócitos e macrófagos-GM-CSF no tratamento da leishmaniose cutânea causada por Leishmania guyanensis na região de Manaus. Amazonas

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

FOLHA DE JULGAMENTO

ESTUDO DE EFICÁCIA E EFETIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO MILTEFOSINA E FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS E MACRÓFAGOS-GM-CSF NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania guyanensis* NA REGIÃO DE MANAUS, AMAZONAS

LUCIANA MENDES DOS SANTOS

"Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado".

Banca Julgadora:

_____
Presidente

_____
Membro

_____
Membro

_____
Membro

DEDICATÓRIA

Ao maior amor da minha vida, minha filha Sara
Aos meus pais, Geraldo e Joselita, por todo ensinamento, inspiração e dedicação com a qual cuidaram de mim
Aos meus irmãos, Ana Carolina, Maíra e Carlos Henrique, por todo amor e incentivo

AGRADECIMENTOS

Minha profunda gratidão a todas as pessoas que tornaram possível a realização desse trabalho e fizeram com que a caminhada durante esse período fosse mais leve e prazerosa. Deixo aqui registrado, meus sinceros agradecimentos.

Ao Dr Jorge Guerra, meu orientador, que me motivou a iniciar essa jornada e nunca deixou de acreditar em mim

Ao Bleno Leonam, que me acompanhou durante toda a jornada do projeto, me deu forças para nunca desistir e me mostrou, com toda sua paciência, bondade e fé em Deus, o quanto podemos ser resilientes diante das adversidades da vida.

Aos meus tios que sempre me deram amor e apoio

À Dra. Graça Barbosa V Guerra, por todo ensinamento, pela revisão e correção dos textos, e pelo jeito maternal de ser, que nos corrige com retidão mas sem perder o carinho e ternura

À Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-HVD), que foi onde aprendi dermatologia e permitiu que eu realizasse esse projeto.

Á Universidade do Estado do Amazonas (UEA) que foi fundamental para eu ingressar no doutorado e seguir nessa jornada de aprendizado e formação *stricto sensu*

Á Universidade Federal da Bahia, pelo suporte financeiro para a realização desse projeto

Ao Dr Paulo Machado, pela confiança, paciência e por ser um exemplo de ser humano e profissional para mim.

Ao Dr Edgar Carvalho Filho, coordenador do projeto, e meu co-orientador, por ter acreditado e confiado em mim.

À Maria Auxiliadora Chiarion, que foi fundamental no processamento e análise das culturas parasitológicas do estudo

À Yolanda Noguth e Denison Vital, pela realização das culturas de *Leishman*ia

A Arineia Silva e George Vilarrouco, pela execução das técnicas de PCR para identificação das espécies de *Leishmania*

Ao Claudemir Felix e Natália Silva, técnicos responsáveis pela coleta e exame direto dos pacientes atendidos na FMT-HVD

Aos alunos de iniciação científica Ítala, Joel, Gabriela, Lottar e Amanda, que me ajudaram nas coletas de dados dos participantes e trouxeram alegria para os meus dias de atendimento.

À amiga dermatologista Mara Lúcia, que por diversas vezes, me ajudou e aliviou o peso do trabalho

Ao enfermeiro Kim Vinícius que sempre foi solidário e compreensivo aos impasses dos profissionais que atendem na fundação

À Jessica Ortiz, que realizou com maestria as análises estatísticas do estudo

Aos meus amigos, por todo carinho e alegria que me proporcionaram durante esse período.

A todos os residentes de Dermatologia da Fundação de Medicina Tropical que me acompanharam durante o período do estudo, por toda dedicação, carinho e convivência agradável.

A todos os pacientes que aceitaram participar desse estudo com confiança e comprometimento.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Este estudo faz parte de um ensaio clínico multicêntrico encomendado e recomendado pelo Ministério da Saúde, tendo este como agência financiadora

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é um problema de saúde pública e doença negligenciada, cujo tratamento preconizado (administração parenteral) apresenta baixa resposta terapêutica e alta taxa de eventos adversos. Na leishmaniose cutânea (LC), a lesão tecidual e resposta ao tratamento está predominantemente relacionada à resposta imune do hospedeiro, por isso agentes imunomoduladores, como o fator de crescimento estimulante de colônia de granulócitos monócitos (GM-CSF), têm sido utilizados como opções no tratamento. Na região amazônica, onde o principal agente etiológico é a *Leishmania guyanensis*, a resposta terapêutica ao antimonial é menor que 50%, entretanto, estudos recentes mostram que a miltefosina, administrada por via oral, apresentou maior eficácia no tratamento de pacientes com leishmaniose cutânea ocasionada por essa espécie. O objetivo desse trabalho foi avaliar se a taxa de cura da associação do GM-CSF à Miltefosina era superior ao uso isolado da medicação e a incidência de eventos adversos, no tratamento da leishmaniose cutânea. Trata-se de ensaio clínico, placebo-controlado e randomizado em três grupos de intervenção, na proporção 1:1:1. Nesse estudo, 150 indivíduos atendidos no ambulatório de leishmaniose da Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e com diagnóstico clínico e laboratorial de leishmaniose, foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos: Grupo 1(G1) = (antimonial de meglumina), G2=(Miltefosina+GM-CSF) e G3(Miltefosina + placebo), cada um com 50 indivíduos. Considerou-se como cura definitiva, a reepitelização completa e ausência de infiltração da lesão 90 dias após início do tratamento. As taxas de cura por intenção de tratamento observadas foram de 66%, 58% e 52% para os grupos G3, G2 e G1 respectivamente (p> 0,05). Eventos adversos sistêmicos leves e transitórios foram frequentes em todos os grupos (acima de 85%) mas náuseas (85%) e vômitos (39%) predominaram nos G2 e G3. Um paciente do grupo do antimônio interrompeu o tratamento após evento adverso grave á medicação. Observou-se que a taxa de cura com o uso da Miltefosina superior ao antimônio mas a associação com o GM-CSF não melhorou a resposta terapêutica. No entanto, devido a sua menor toxicidade, via de administração oral e taxa de cura semelhante ao do antimonial, a miltefosina demonstra ser uma opção interessante para o tratamento da LC causada por *L. guyanensis,* principalmente na Amazônia onde o acesso aos serviços de saúde é complicado e, muitas vezes, o responsável pela interrupção do tratamento dessa doença.

Palavras Chaves: Miltefosina. Leishmaniose Cutânea. Tratamento. Imunomodulador. GM-CSF

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a public health problem and neglected disease, whose recommended treatment has a low therapeutic response and a high rate of adverse events. In the Amazon region, where the main etiological agent is *Leishmania guyanensis*, the therapeutic response to antimonial is less than 50%. Recent studies indicate that miltefosine, administered orally, is the most effective drug for treating patients with Cutaneous Leishmaniasis caused by *L. (V.) guyanensis* when compared to the pentavalent antimonial. In Cutaneous Leishmaniasis, tissue damage and response to treatment are predominantly related to the host's immune response, so immunomodulatory agents, such as monocyte granulocyte colony-stimulating growth factor (GM-CSF), have been used as treatment options.This is a clinical, placebo-controlled and randomized trial in three intervention groups, in a 1: 1: 1 ratio. In this study, 150 individuals treated at the leishmaniasis outpatient clinic of the Tropical Medicine Foundation Dr Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) and with clinical and laboratory diagnosis of leishmaniasis were randomly assigned to 3 groups: group 1 (meglumine antimonial), group 2 (Miltefosine+GM-CSF) and group 3 (Miltefosine + placebo). Complete reephitelization and absence of infiltration of the lesionwere considered as definitive cure 90 days after the start of treatment. Intention cure rates were 66%, 58% and 52% for the Miltefosina + placebo, Miltefosina + GM-CSF and meglumine antimonial groups respectively ($p > 0.05$). Mild and transient systemic adverse events were frequent in all groups (over 85%) but nausea (85%) and vomiting (39%) predominated in the miltefosine groups. A patient in the antimony group stopped treatment after experiencing fever, rash and severe arthralgia. Miltefosina presented a higher cure rate than antimony in hith association of GM-CSF did not improve the therapeutic response. However, due to its lower toxicity, oral administration and cure rate similar to that of antimonial, miltefosine should remain one of the main drugs for the treatment of LC caused by *L. guyanensis.*

Keywords: Miltefosine. Cutaneous Leishmaniasis. Treatment. Immunomodulator. GM-CSF

RESUMO LEIGO

A leishmaniose conhecida também pelos nomes de úlcera de Bauru, nariz de tapir, botão do oriente e ferida brava, é uma doença que causa feridas na pele, boca e nariz.
As pessoas contraem a doença principalmente quando estão nas matas e nas zonas residenciais próximas a áreas de desmatamento. O tratamento é feito com injeções de medicamentos que não conseguem eliminar o parasita com facilidade e que causam muitas reações no corpo. O tempo de tratamento e cicatrização das feridas é longo, e a maioria das pessoas que tem essa doença, mora em estradas e na zona rural, com difícil acesso aos postos de saúde, dificultando o uso dos medicamentos. Por isso, pesquisas que buscam remédios mais seguros, como em comprimidos e que curem os pacientes mais rapidamente são importantes. Existe uma medicação em comprimidos que já foi estudada e mostrou que é segura, fácil e a maioria das pessoas ficam curadas, chamada miltefosina. Apesar de ter sido comprovado que essa medicação é melhor que o glucantime, remédio que usamos na maioria das pessoas com a doença, ela não cura todos os pacientes. Para tentar curar mais rápido as pessoas com a leishmaniose, alguns pesquisadores usaram remédios que melhoram as defesas do corpo contra esses microorganismos junto as medicações usadas no tratamento. Uma dessas medicações é uma pomada, que se usa sobre as feridas, chamado de GM-CSF, que ativa nosso sistema imunológico e ajuda as células do nosso corpo a matarem o parasita. Nesse estudo avaliamos 150 pessoas em três grupo de 50, dois grupos tratadas com a miltefosina (comprimidos), um grupo associado com pomada e outro sem, e um grupo com glucantime (injetável). A conclusão foi que a miltefosina é uma boa medicação para tratar a leishmaniose porque é fácil de usar, pode ser tomada em casa, é mais eficaz que o antiminial e não causa reações no corpo graves, que coloquem as pessoas em risco de vida. Quanto ao uso da pomada de GM-CSF, esta não mostrou que tem efeito e o uso da miltefosina sozinha seria a melhor opção.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Procedimento de cultura parasitológica para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar em meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN).

Anexo 2: Exame parasitológico direto pelo método de escarificação para diagnóstico laboratorial de Leishmaniose Tegumentar.

Anexo 3: Procedimento de manutenção e repicagem.

Anexo 4: Preparo de meio cultura de fase sólida MacNeal, Novy e Nicolle (NNN).

Anexo 5: Retornos para consultas programadas.

Anexo 6: Extração Biopsia.

Anexo 7: Plano de gerenciamento da obtenção do TCLE.

Anexo 8: Plano de recrutamento e retenção dos participantes.

Anexo 9: CONSORT.

Anexo 10: Parecer consubstanciado do CEP.

Anexo 11: Outras produções cientificas: Aceite do artigo intituldado “Chronic paronychia as a manifestation of skin leishmaniasis.”

Anexo 12: Outras produções cientificas: Publicação do artigo intitulado “Ramsey hunt syndrome after antimonial treatment for American Cutaneous Leishmaniasis.”

LISTA DE TABELA E FIGURAS

Tabela 1: Características demográficas, clínicas e laboratorais de 150 pacientes com leishmaniose na região Amazônica

Tabela 2: Taxa de cura dos pacientes com leishmaniose na região amazônica tratados com miltefosine mais Placebo, Miltefosine mais GM-CSF e antimoniato de meglumina por intenção de tratamento

Tabela 3: Frequencia de reações adversas nos pacientes tratados com miltefosina e antimoniato de meglumina

Figura 1: Curva de *Kaplan Meyer mostrando a proporção de pacientes não curados*

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
ABI 3730	Applied Biosystems
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cm	Centímetro
CNS	Conselho Nacional de Saúde
D	Dia
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado
GM-CSF	Fator de crescimento estimulante de colônia de granulócitos monócitos
gp63	Glicoproteína 63
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN	Interferon-gama
IL 10	Interleucina 10
Kg	Quilograma
L. (V.) guyanensis	*Leishmania guyanensis*
LC	Leishmaniose Cutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
Mg	Miligrama
Mgcl2	Cloreto de Magnésio
Mm	milímetro
MS	Ministério da Saúde
NNN	Meio de cultura Neal, Novy, Nicolle
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Sb^V	Antimonial Pentavalente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF	Fator de necrose tumoral
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16

1.1 HISTÓRICO 16
1.2 EPIDEMIOLOGIA 18
1.3 ETIOLOGIA 20
1.4 DINÂMICA DE TRANSMISSÃO 21
1.4.1 VETORES 22
1.4.2 RESERVATÓRIOS 22
1.5 FISIOPATOLOGIA E IMUNOLOGIA DA DOENÇA 23
1.6 ASPECTOS CLÍNICOS 26
1.7 DIAGNÓSTICO 28
1.8 TRATAMENTO 30

2. OBJETIVOS 36

3. PRODUTO DA TESE 36

4. CONCLUSÃO 55

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA TESE 56

5. ANEXOS 65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

As leishmanioses remontam aos tempos dos faraós (1,2). As primeiras descrições da doença foram realizadas por Alexander Russel em um paciente da Turquia, onde a doença era conhecida como "*Aleppo boil*". Admite-se que as leishmanioses tegumentares sejam uma doença autóctone do continente americano, chamando-se, por isso, LTA. Altamiro-Enciso et al. (1) , ao descrever sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas, aponta que as teorias sobre a origem e difusão das leishmanioses evoluíram principalmente durante as eras bacteriológica e epidemiológica. Assim, a partir de 1890, Juliano Moreira e Aguiar Pupo propunham a primeira teoria de origem mediterrânea, enfatizando que os casos observados em pacientes da Bahia, doença chamada botão da Bahia eram parecidos aos do botão do Oriente. Esta comparação fez supor, inclusive, que as LTA teriam sido introduzidas pelos fenícios ou sírios que supostamente chegaram ao Nordeste do Brasil ainda na Antiguidade, muito embora tais viagens na Antiguidade jamais tenham sido provadas historicamente ou arqueologicamente.

A segunda teoria é de origem andina, que começa a formular-se a partir dos descobrimentos de peças de cerâmica pré-colombiana ou huacos peruanos em 1895 (1) e reforçada pelos documentos do século XVI. Contudo, a discussão dos dados históricos é controversa, dividindo-se em dois grupos. Uma primeira corrente é representada pelos defensores das chamadas evidências históricas, conforme Jiménez de La Espada (1), cujos argumentos se reforçam pelos estudos das representações de lesões feitas em objetos de cerâmica. Um outro grupo de estudiosos refuta essa teoria, alegando que os cronistas não tinham conhecimento técnico-científico para confirmar o diagnóstico e, portanto, fizeram vagas descrições sobre o mal (1).

Thomas-Soccol et al.(3) propuseram a chamada teoria monofilética para origem das leishmânias , baseando-se em estudos de DNA mitocondrial de vinte espécies diferentes de leishmânias do mundo e consideram que os subgêneros *Viannia* e *Leishmania* tiveram origem comum, remontando aos períodos cretáceo e jurássico, há 120 milhões de anos, quando os continentes estavam unidos na pangéia. Contudo, a questão sobre o local de origem das espécies de *Leishmania* continua controversa, entre as regiões neotropical, paleoártica ou africana (4).

A primeira referência sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado no livro de Tello intitulado “Antiguidad de la Syfilis en el Peru”, onde ele relata a viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros de Tabatinga (AM) até o Peru, percorrendo as regiões do vale amazônico (1)

O primeiro a observar o parasito do gênero *Leishmania* foi Cunningham, em 1885, na Índia, em casos de leishmaniose visceral. No novo mundo, foram inicialmente designadas como “botão do oriente”. No Brasil, Cerqueira, em 1855, observara a existência da moléstia da pele, identificando-a clinicamente como botão de Biskra. Em 1895, na Itália, Breda, descreveu a moléstia em italianos provenientes de São Paulo. Os primeiros registros da LC sulamericana foram feito por Lindenberg em 1909 (5).

No Brasil, a natureza leishmaniótica das lesões cutâneas e nasofaríngeas só foi confirmada, pela primeira vez, em 1909, por Lindenberg, que encontrou formas de duas *Leishmania* idênticas à *Leishmania tropica* (leishmaniose do Velho Mundo, descrita por Wright, em 1903) em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do estado de São Paulo (1)

A teoria de Marzochi et al. (6) sobre a origem amazônica da L. (V) *braziliensis* defende que a doença se dispersou primeiro para a selva alta e posteriormente para as terras quentes interandinas, através dos limites da Bolívia e do Peru com o Brasil. As diversas migrações humanas que interligaram as regiões andina e amazônica teriam disseminado

a infecção a partir de períodos arqueológicos como referem as cerâmicas pré-incaicas. Segundo essa teoria, baseada em estudos epidemiológicos e de distribuição geográfica desta espécie em diferentes ecossistemas, a doença humana no Brasil iniciou na região amazônica ocidental, principalmente ao sul do rio Marañon-Solimões-Amazonas e que o processo de dispersão para outras áreas do Brasil é recente e ocorreu principalmente durante o ciclo econômico da borracha, entre 1880 e 1912, que atraiu milhares de nordestinos para a região. Após o declínio desse ciclo, essa população retornou às suas origens, atraída pela expansão do cultivo do café, migrou por volta de 1930, para a Região Sudeste, período em que se iniciou a grande epidemia da LTA (1)

1.2 Epidemiologia

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças doenças crônicas infecto-parasitárias, causada por diversas espécies de parasitas pertencentes aos gênero *Leishmania*, de apresentação polimórfica, variando desde lesões de pele com evolução autolimitada até a forma visceral fatal (7) A LTA é a forma mais comum e pode afetar a pele, cavidade oral, nasal, faringe e laringe (8). Está entre as seis doenças infecto-parasitárias mais importantes no mundo e é considerada negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (9,10). Constitui um problema de saúde publica em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, Africa e Asia) (11,12). Estima-se que existam 12 milhões de pessoas infectadas no mundo e 2 milhões de casos por ano, sendo 1,5 milhões casos de leishmaniose tegumentar.

A LTA ocorre nas Américas, do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, com exceção do Uruguai e do Chile. No continente americado, a incidência estimada varia de 187.200 a 307.800 casos, dos quais quase 40% ocorrem no Brasil (13)

Em 2019, os países com maior número de casos notificados nas Americas foram Brasil (15.484), Colômbia (5.907), Peru (5.349), Nicarágua (3.321) e Bolívia (Estado Plurinacional da) (2.052), que juntos representam 77% dos casos na Região (14). No Brasil, a análise epidemiológica da doença do ano de 2007 a 2017 (os dados mais

recentes) mostra que a LC está atualmente presente em todos os estados brasileiros em todas as cinco regiões, com um total de 235.301 casos notificados. O norte e as regiões Nordeste são as mais afetadas, com 101.332 e 72.395 casos notificados, respectivamente. Em 2015, a região Norte apresentou o maior coeficiente de incidência(51,1 casos / 100 mil habitantes), seguido pelo Centro-Oeste (19,0 casos / 10.000 habitantes) e Nordeste (9,1 casos / 100.000 habitantes) (9). Os estados do Pará e Amazonas em o norte responde por 58% de todos os casos(15). De acordo com o boletim epidemiológico produzido pela Vigilância Sanitária do Departamento no Brasil, mais de 300.000 casos de LCA foram registrados entre 2003 e 2018, com média anual de 21.158 (16).

Na região Norte do Brasil, o estado do Amazonas (AM) possui uma incidência especialmente alta de casos e transmissão, que está frequentemente relacionado ao tipo de ocupação exercida pela maioria dos indivíduos acometidos, atividades de extração vegetal, desmatamento desordenado e programas de lazer florestal. Devido a estes atividades, os humanos se expõem ao ciclo selvagem da doença e acabam se infectando (17).

No Estado do Amazonas o município de Manaus é responsável por cerca de 60% dos casos de LTA (18,19) a grande maioria originado principalmente da periferia da região metropolitana de Manaus e procedente das estradas - AM 010 e BR 174, que ligam Manaus a Itacoatiara e Boa Vista, respectivamente, principalmente em trabalhadores de assentamentos agrícolas nessas localidades. Outra atividade que contribui com um número significativo de casos de LC é o treinamento realizado por organizações militares na selva (17,20)

Nesse estado, a LTA é primariamente uma zoonose, com ciclo de transmissão ocorrendo entre os flebotomíneos e os animais silvestres. Na maioria das vezes, o homem se infecta ao alterar o ambiente interpondo-se ao ciclo silvestre ao penetrar nesse ecossistema (20,21). Na periferia de Manaus, o nível de exposição dos indivíduos acometidos está relacionado diretamente a processos de ocupação desordenada ou às chamadas

invasões. Nesse contexto, a ocorrência da leishmaniose tegumentar costuma predominar em lugares de assentamentos populacionais recentes e relacionados a desmatamentos em populações próximas a áreas de floresta primária, onde a *Leishmania (Viannia) guyanensis* é enzoótica. (22)

A transmissão também ocorre no intra e no peridomicílio justificada pela proximidade com as áreas de floresta, pois grande parte das casas em assentamentos populacionais recentes é construída a menos de 100m da orla da floresta e os indivíduos são alcançados pelo raio de ação dos vetores, que chegam às casas também atraídos pela luz. (20,23)

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), autarquia do estado do Amazonas, atende em média 54,2% dos casos de leishmaniose do estado, sendo a maioria procedente da periferia da cidade de Manaus e das margens das duas rodovias supracitadas (18–20). O número crescente de desmatamento da área urbana periférica, com assentamento de casas próximos a fragmentos florestais, tem contribuído para aumento de casos de leishmaniose na capital (22)

1.3 Etiologia

A LTA é causada por espécies de *Leishmania*, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com duas morfologias principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados. O gênero *Leishmania* compreende um número crescente de espécies, atualmente cerca de 30, das quais cerca de 20 causam doenças em humanos (21,24)

Até a presente data, sete espécies de *Leishmania* causadoras de doença tegumentar foram identificadas no Brasil, sendo seis do subgenero *Viannia* e uma do subgenero *Leishmania* apenas a *Leishmania (Viannia) lindemberg* ainda não foi registrada no Amazonas (15,21).

1. *Leishmania* (*Leishmania) amazonensis*: agente etiológico de LTA, incluindo a

forma anérgica ou leishmaniose cutânea difusa. Seus reservatórios são roedores e marsupiais.

2. *Leishmania (Viania) braziliensis*: é a espécie de maior prevalencia no homem e pode causar lesões cutâneas e mucosas. É encontrada em todas as zonas endêmicas do País, desde o norte até o sul, tanto em áreas de colonizações antigas ou recentes, estando geralmente associada à presença de animais domésticos.
3. *Leishmania (V.) guyanensis*: causa sobretudo lesões cutâneas. Ocorre na margem norte do Rio Amazonas em áreas de colonização recente, estando associada com desdentados e marsupiais.
4. *Leishmania (V.) lainsoni*: registrada apenas na Amazônia, Pará e Amazonas, tem a paca como animal suspeito de reservatório natural.
5. *Leishmania (V.) lindenbergi*: recentemente descrita no estado do Pará a partir de um surto em um grupo de militares em área de selva, parece associada ao vetor *Lutzomyia (Nyssomyia) antunesi*
6. *Leishmania (V.) naiffi*: ocorre na Amazônia, nos Estados do Pará e Amazonas, tendo o tatu como reservatório natural. O parasito causa LTA de evolução benigna.
7. *Leishmania (V.) shawi*: responsável por casos esporádicos no Amazonas e Pará, tem como reservatórios vários animais silvestres como macacos, preguiças e procionídeos.

No Brasil, as espécies mais importantes são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, que é a principal espécie causadora da LTA encontrada em todo o país e a *Leishmania (Viannia) guyanensis*, principal agente etiológico das formas tegumentares da leishmaniose na região amazônica (19,25,26)

1.4 Dinâmica de transmissão

A interação reservatório-parasito é considerada um sistema complexo, na medida em que é multifatorial, imprevisível e dinâmica, formando uma unidade biológica que pode estar em constante mudança em função das alterações do meio ambiente (5). Consideram-se reservatórios, as espécies de animais que garantem a circulação de *Leishmania* na

natureza dentro de um determinado de tempo e espaço. Entre eles estão os insetos vetores denominados flebotomineos, pertencentes a Ordem *Díptera*, Família *Psychodidae*, Subfamilia *Phlebotominae*, Genero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito-palha, tatuquira, birigui, entre outros (9), os reservatórios incluem várias espécies de mamíferos principalmente silvestres (4,22,27).

1.4.1 Vetores

No Brasil, os principais vetores são a *Lutzomyia intermédia* e *Lu. whitmani*, implicadas na transmissão da *Leishmania (V.) braziliensis*, a *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lu. olmeca nociva* na transmissão da *Leishmania (L.) amazonensis* e a *Lutzomyia umbratilis e Lu. anduzei*, implicadas na transmissão da *Leishmania (V.) guyanensis* (9,28). A transmissão da leishmaniose tegumentar americana na região de Manaus é atribuída às *Lutzomyia umbratilis* e *Lutzomyia anduzei*, considerados, respectivamente, vetores principal e secundário da *L. (V.) guyanensis* (28). No ciclo silvestre do estado do Amazonas, o vetor *Lutzomyia umbratilis* tem o hábito de se alimentar de sangue de preguiças e outros animais que ficam na copa da floresta durante a noite e que descansam nas bases das árvores durante o dia (29) (5)

1.4.2 Reservatórios

Infecções por *Leishmania* que causam a LT foram descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos tais como o *Tamandua tetradactyla* (tamanduá), *Proechimys* sp. (rato silvestre) e o *Didelphis marsupialis* (gambá). Na Amazônia brasileira e em alguns locais da Guiana Francesa nas áreas de floresta primária, dentre os possíveis reservatórios silvestres da *L. (V.) guyanesis*, a preguiça (*Choloepus didactylus*), tem sido apontada como o principal (18). Os parasitas podem ser encontrados na pele e nas vísceras desses animais. *D. marsupialis* adquire especial importância em áreas de floresta alteradas pelo homem com uma taxa de infecção na região de Manaus de mais de 20% (18,19). Trata-se de um animal com uma alta tolerância à presença humana, que se

alimenta de lixo doméstico e se interpões entre o meio florestal, onde se infecta, e o ambiente humano, onde serve de fonte de infecção para os flebótomos ali presentes .

1.5 Fisiopatologia e imunologia da doença

Vetores infectados, ao realizarem o repasto sanguíneo no homem, inoculam formas promastigotas da *Leishmania* juntamente com sua saliva. Os neutrófilos representam o primeiro grupo de leucócitos a chegar ao local da infecção e recrutam macrófagos, células onde os protozoário invadem e se proliferam (30). Essas células imunes fagocitam o parasita, migram para o linfonodo e transformam-se em células dendríticas maduras para apresentarem o antígeno processado para as células T e liberam IL-12, citocina essencial para indução da resposta Th1 (25). Está bem estabelecido, através de estudos em murinos, que a resistência à leishmaniose cutânea está associada ao desenvolvimento de resposta T-helper tipo 1 (Th1) caracterizada pela produção de IL-12 e IFN-γ, enquanto as cepas genéticas que induzem a resposta Th2, com liberação de citocinas IL-4 e IL-10, são suscetíveis a formas de menor resistência (31,32).

A resposta celular de padrão Th1, orquestrada pela IL-12 e pelo IFN- γ recruta macrófagos, células NK, CD4+ e CD8+ para o sítio da infecção. Outra citocina importante na resposta Th1 é o TNF cujo papel na resposta imune da LC inclui secreção de metaloproteinases e óxido nitroso, liberação de citocinas pro-inflamatórias, indução de apoptose e citotoxidade nas células infectadas. O perfil de citocinas e padrões de resposta Th1 ou Th2, nas fases iniciais da resposta imune do hospedeiro contra o parasita é crucial para a evolução clínica. A IL-4, IL-10 e a IL-13 são marcadores da resposta humoral, pouco eficaz na eliminação de parasitas intracelulares e responsável pela manutenção da infecção. Os Assim, enquanto na LC localizada existe uma resposta Th1 predominante, na leishmaniose cutânea difusa a resposta Th2 é dominante (32,33).

O desenvolvimento de uma resposta Th1 conduzida pela produção de IL-12 e IFN-γ acoplada ao recrutamento de células efetoras compreendendo macrófagos, células NK,células CD4 + e CD8 + para o local da infecção são críticas para o controle de LC (34).

Em contraste com seus papéis de proteção, a produção excessiva de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias promove a expressão de moléculas de adesão, levando ao recrutamento amplificado de células do sangue. Esse processo contrubui para o aumento da resposta inflamatória que pode resulltar em maior dano tecidual e gravidade da doença (34).

Existe uma correlação entre tamanho da lesão na LC e taxa de produção de citocinas inflamatórias (35) e estudos mostram que a quantidade de TNF-α e IFN-δ diminuem no sítio da infecção após a terapia e a cura da lesão (31,36,37).

Espir et al.(2014) avaliaram a produção de citocinas em pacientes com LC infectado com diferentes Leishmania spp. Eles observaram altos níveis de IL-2 e de IFNγ no grupo de pacientes infectados com *L. guyanensis*. No entanto, tem sido demonstrado que lesões causadas por L. guyanensis também podem apresentar alta quantidades de citocinas Th2, especialmente IL-13. Esta citocina pode inibir a expressão do receptor de IL-12 em células T levando a uma resposta imune Th1 deficiente (38,39). Bourreau et al (38) demonstrou que as células T regulatórias (Treg) se acumulam preferencialmente na fase inicial (duração da lesão inferior a 1 mês) da LC causada por *L.guyanensis* e os níveis de transcrições de mRNA Foxp3 são significativamente maiores em amostras de pacientes com lesões crônicas sugerindo um papel crítico das células Treg intralesionais na LC crônica. Células Treg intralesionais de pacientes com fases agudas e crônicas de LC parecem ter funções supressoras in vitro, uma vez que inibem a liberação de interferon gama (IFN-) produzido por linfócitos T CD4 (38).

Um perfil de resposta predominantemente Th2 foi encontrado em pacientes infectados com *L. guyanensis* em área endêmica ao norte do rio Amazonas(30). Nesses pacientes, o reconhecimento de antígeno reduzido ou não detectável foi associado a altos níveis de

IL-10 e IL-5 bem e baixos títulos de anticorpos (30). A infecção por *L. guyanensis* afeta a expansão de clones de linfócitos T específicos para antígenos, causando baixa proliferação de linfócitos e diminuição da produção de IFNγ. A indução de altos níveis de citocinas do perfil Th2 altera as respostas do tipo Th1, permitindo a replicação do parasita. Desse modo, os baixos níveis de respostas imunes celulares e humorais durante a infecção causada por *L. guyanensis* podem explicar a alta carga parasitária nos tecidos e a recorrência da doença quando comparada à infecção causada por L. braziliensis (30).

Considerando a regulação das respostas imunes durante a infecção por *L. guyanensis*, a expressão de citocinas supressoras tem sido documentada, principalmente em pacientes com falha terapêutica. Alta expressão de IL-10 em lesões LCL causadas por *L. guyanensis* foi associado à falha no tratamento com pentamidina (40). Além disso, pacientes com LC por L. guyanensis não tratados ou pacientes que apresentaram falha no tratamento mostraram ausência de resposta de células T específicas à IL-12. Esses resultados sugeriram que a falta de resposta de IL-12 contribui para a persistência de parasitas (40).

A citocina IL-10 tem um papel regulador durante as respostas imunes envolvendo a inibição de mediadores inflamatórios e a ativação de monócitos / macrófagos necessários para controlar a imunopatologia na LC. Além disso, a produção de IL-10 por células T reguladoras está associada à persistência do parasita e reativação da doença (Mendez et al. 2004). Kariminia et al. (41) demonstraram que células mononucleares de indivíduos saudáveis infectados com *L. guyanensis in vitro* produzem o fator de crescimento transformador β (TGFβ), uma citocina que promove a escape de parasitas de mecanismos de proteção durante e infecção murina pela inibição de macrófagos.

O outro fator de importante que influencia a imunopatologia da doença é a presença do vírus de RNA (LRV), que é um fator de virulência chave associado com o desenvolvimento de formas graves e resistentes de leishmaniose mucocutânea (42). Esses vírus são capazes de mediar a intensidade da manifestação da doença por mecanismos de ativação do receptor toll-like 3 (TLR3). Na LC causada por *Leishmania guyanensis*, o ácido nucléico

do vírus RNA de Leishmania (LRV1) atua como um potente imunógeno inato, provocando uma resposta imune hiperinflamatória por meio do receptor 3 *Toll-like* (TLR3). A cascata inflamatória resultante aumenta a gravidade da doença, a persistência do parasita e talvez até resistência a drogas antileishmania (34).

1.6 Aspectos clínicos

O espectro clínico da LT em humanos varia de formas assintomáticas e subclínicas a formas cutâneas classificadas como leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea disseminada e leishmaniose cutânea difusa (43) (3). As manifestações clínicas da doença são determinadas por interações entre o hospedeiro, a espécie de *Leishmania* envolvida e a resposta imunológica do indivíduo infectado. A LC é a apresentação clínica mais comum da LT no mundo, e responsável por mais de 90% dos casos no Amazonas (20) (2).

Os sintomas da LC se desenvolvem cerca de 2 a 8 semanas após a picada do flebotomíneo infectado, dependendo da espécie infectante. A linfadenopatia pode se desenvolver como a primeira indicação da doença, especialmente no caso de infecções por *L. (V.) braziliensis*. A LC caracteriza-se, inicialmente, por uma pápula eritematosa, única ou múltipla, que evolui para úlcera com bordas elevadas, contornos regulares e fundo com granulações grosseiras, podendo estar recobertas por exsudato seropurulento. Manifestações clínicas atípicas como verrucosas, papulosas, sarcoídicas, impetigoides, tuberosas e gomosas não são incomuns e esse polimorfismo morfológico dificulta o diagnóstico clínico nos casos de evolução crônica, quando o encontro de parasitas no tecido é difícil de visualizar. Ao redor da lesão principal, podem surgir infiltrações. O acometimento linfonodal nas formas cutâneas é comum e pode acometer o trajeto linfático adjacente à lesão, assumindo um aspecto esporotricoide (44). Eventualmente, pode haver formação de ulceras no trajeto, porém não e comum observar a formação de gomas, com supuração e fistulização das lesões (44). Em muitos casos, as lesões são capazes de autocura sem tratamento. No entanto, a cicatrização pode ocorrer após vários meses a anos e resulta na formação de uma cicatriz deprimida e hipopigmentada. A resolução da

lesão não corresponde a uma cura estéril, pois parasitas ou DNA do parasita podem ser encontrados nas cicatrizes de pacientes curados, anos após o tratamento eficaz com cura clínica (45).

Em até 2% dos casos pode ocorrer a disseminação das lesões cutâneas caracterizadas pelo aparecimento de multiplas lesões em diferentes segmentos corporais, envolvendo com frequencia a face e o tronco. A disseminação ocorre posteriormente ao desenvolvimento das lesoes primarias, provavelmente por disseminacao do parasito por via hematogênica ou via linfática, entretanto na Amazonia isso pode ocorrer em decorrência de múltiplas inoculações pela picada dos vetores (9,24,46).

A leishmaniose mucosa apresenta lesões no revestimento mucoso das vias aéreas superiores e podem ser ulceradas e perfurantes ou vegetantes e necróticas. O acometimento do septo nasal costuma preceder o das demais estruturas e quando ocorre a destruição dessa região, ocorre o desabamento do nariz conferindo aos doentes o aspecto conhecido como nariz de tapir ou de anta. Sintomas como obstrução nasal, epistaxe, disfonia e rinorréia são comuns. Pode ocorrer a destruição da óssea e cartilaginosa das estruturas acometidas e ocasionar deformidades, problemas na deglutição, fonação, respiração, além de morte devido complicações respiratórias (9,24,46). No Brasil, a principal espécie relacionada a Lc mucosa é a *L.brasiliensis*, no entando, Guerra et al (19) isolaram *L. guyannensis* em 1/3 de uma série de casos de Lc mucosa registrados na Amazonia.

A forma difusa compreende a manifestação clínica do polo anérgico da resposta imune. Caracteriza-se pela presença de placas, pápulas e nódulos, de aspecto infiltrativo, disseminadas pelo tegumento. Evolução crônica, insidiosa e refratariedade ao tratamento são aspectos marcantes dessa forma de leishmaniose tegumentar. (9)

O principal agente etiológico da região amazônica é a *Leishmania guyanensis*, em contraste com a *Leishmania brasiliensis*, que predomina nas demais regiões do país (43) (3). No estudo de Naiff et al. (47), das espécies de *Leishmania* identificadas de 65

indivíduos portadores de leishmaniose tegumentar americana da região amazônica brasileira, a *L. (V.) guyanensis* foi encontrada em 83% dos casos, dos quais, 91% apresentavam lesão cutânea. Essa diferença etiológica é responsável por peculiaridades nas características clínicas das lesões causadas pela *L. (V) guyanensis,* como presença de úlceras menores e mais numerosas, acometimento frequente dos linfonodos, encontro de grande quantidade de parasitas nas lesões cutâneas e pior resposta terapêutica aos antimoniais (48). Além disso, o acometimento mucoso é pouco frequente e as lesões cutâneas predominam nas áreas expostas ao vetor como nos membros inferiores (29,48). A LC causada por *L. braziliensis* apresenta resposta linfoproliferativa exacerbada com produção elevada de IFN-γ enquanto que as infecções por *L. guyanensis* parecem induzir liberação de citocinas antiinflamatórias, como IL-10, permitindo a replicação contínua do parasita (30). Essa diferença resulta na relativa escasssez de formas amastigotas detectadas nas lesões cutâneas causadas por *Leishmania brasiliensis* e elevada carga parasitária na CL causada por *L. guyanensis* (49). Clinicamente, essa diferença na resposta imunológica entre as espécies parece ser responsável por diferenças na apresentação das lesões: no caso das lesões por *L. guyanensis,* as úlceras são mais rasas, predominando tecido fibrinogranuloso no fundo da úlcera, bordas menos elevadas e menores dimensões além de reepitelização mais rápida quando comparada ás lesões ccausadas por *L. brasiliensis* (48,50).

1.7 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da LC requer demonstração do parasito ou de seus produtos em amostras coletadas do local da lesão. No entanto, diversos fatores influenciam na sensibilidade dos métodos diagnósticos e, por isso, a correção clínica, laboratorial e epidemiológica é essencial quando não é possível detectar o agente etiológico. A chance de se encontrar o parasita é inversamente proporcional ao tempo de duração da lesão e a sensibilidade do método nos casos produzidos por *L. braziliensis* está em torno de 100% nos dois primeiros meses de evolução, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses (46).

O diagnóstico laboratorial das leishmanioses inclui os métodos diretos de observação do parasito, que podem ser obtidos por meio de: escarificado de lesão com exame em lamina de vidro corado pelo GIEMSA; isolamento do parasito em meios de cultura, a partir de fragmentos de biópsia e/ou aspirado de lesão; *Imprint* em lamina de vidro a partir de material coletado de biópsia de pele ou mucosa e visualização do parasito em cortes histológicos de biópsia e a pesquisa do DNA do parasito pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (46,51,52).

Os métodos indiretos incluem: o exame histopatológico, que pode ser considerado compatível com leishmaniose de acordo com o aspecto histopatológico encontrado; a sorologia, onde são mais utilizados a Reação de Imunofluorescencia Indireta (RIFI) e os ensaios imunoenzimáticos (enzyme linked immunosorbent assay-ELISA) (53,54).

Anticorpos monoclonais específicos têm sido usados há vários anos para identificar Leishmania spp. e tem demonstrado alta especificidade na caracterização de espécies deste parasita, comprovando de forma inequívoca sua identificação (21).

A técnica de eletroforese compõe o arsenal da biologia molecular para identificação das espécies de *leishmania.* Esta técnica visa determinar as variações entre proteínas mediante a migração diferencial destas quando submetidas a uma corrente elétrica. Através das diferenças na mobilidade eletroforética das proteínas, que podem ocorrer em função da carga elétrica, forma estrurural ou peso molecular é possível distinguir os organismos. A dificuldade na interpretação dos resultados, devido ao perfil complexo de bandas que são obtidas na análise eletroforética de proteínas, passou-se a utilizar proteínas de açãon enzimática(21)

A eletroforese de enzimas (multilocus eletroforese enzimática, MLEE) é um método considerado como padrão-ouro na caracterização de cepas de Leishmaniae e constitui ferramenta útil para caracterizar categoricamente o parasita, revelando polimorfismos que expressam fenótipos de variações populacionais e permitem classificar taxonomicamente as diferentes espécies de Leishmania (21,26).

1.8 Tratamento

A terapia para LC varia de tópica a sistêmica; por exemplo, a termoterapia local, por exemplo, é associado a alta eficácia em CL no Velho Mundo (55). Limitações como o tamanho das úlceras, lesões na face e risco de progressão para a forma mucosa em áreas de transmissão de *L. braziliensis* impõe intervenção sistêmica (55).

Os antimoniais pentavalentes foram introduzidos no Brasil por Gaspar Vianna em 1912 e são utilizados no tratamento da leishmaniose desde 1945. Seu mecanismo de ação é pouco conhecido. *In vitro*, apresentam pequeno efeito sobre as leishmânias mas em modelo animal sua ação depende de fatores como subtipos de células linfócitos T e citocinas. Questiona-se a possibilidade de estimularem mecanismos imunológicos do indivíduo parasitado, como aumento da atividade macrofágica, incremento na produção de citocinas e apoptose de células infectadas (56,57). Outro mecanismo de ação aventado é a inibição de enzimas da via glicolítica e da oxidação de ácidos graxos do parasita (56)

Não há diferenças significativas na farmacocinética dos antimoniais em relação à via de administração e tanto a via intramuscular (IM) ou intravenosa (IV) pode ser utilizada (9). O medicamento é administrado por via endovenosa ou intramuscular e é encontrado em ampolas de 5 ml, contendo 81 mg de antimonio pentavalente (Sb+5) por mL, na dose de 15- 20mg/Kg/dia, com o limite máximo de 3 ampolas, durante 20 dias, conforme recomendação do Ministério da Saúde (9) (1).

A taxa de cura nos casos de LC causada por *L. guyanensis* tratada com antimônio é em torno de cerca de 50% e nos casos de LC causada por *L. brasiliensis*, tem-se observado um declínico gradual nas taxas de cura. A resposta de pacientes ao tratamento com Sbv pode variar de acordo com fatores como a cepa do parasito, o estado imunológico do paciente e a forma clínica (29,48,58). Já foram descritos casos de resistência *in vitro* e *in vivo* a esses medicamentos. Os mecanismos intrínsecos desta “resistência” ainda não

estão totalmente esclarecidos, mas, sabe-se que os parasitas podem ser induzidos a adquirir resistência *in vitro*, através de sua exposição a doses crescentes de estibogluconato de sódio (29). Estudos *in vitro* sugerem que a resistência pode ser secundária à presença de uma P-glicoproteína nas leishmanias mutantes (59) . Um estudo mostrou que os parasitas *L. donovan, in vitro,* com resistência aumentada aos antimoniais desenvolveram um mecanismo para diminuir a atividade da enzima γ-glutamilcistína (γ-GS) do hospedeiro e aumentar sua resistência ao estresse oxidativo incrementando sua própria produção de glutationa pela γ-GS (60).

Alguns aspectos clínicos e epidemiológicos são descritos como fatores de risco de falha terapêutica:sexo masculino, múltiplas lesões cutâneas, crianças e tempo de evolução de doença maior que 4 meses (61,62).

Estudos do DNA do parasito tem mostrado sua ampla diversidade, incluindo subespecies de *L.(V.) brasiliensis.* Variações genéticas de uma espécie podem resultar em diversidade antigênica, da virulência, da patogenicidade e resistência as drogas (52).

Efeitos colaterais com antimônio são comuns e podem causar artralgia, mialgia, inapetencia, nausea, vomito, sensação de plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, insonia, choque pirogenico, edema, hepatite com aumento de transaminases e fosfatase alcalina, insuficiencia renal aguda, pancreatite e alterações dose-dependentes do eletrocardiograma (ECG), tais como alteração da repolarização ventricular com inversão do segmento ST-T, aumento do intervalo QT (QTc), alterações isquemicas e extrasistoles bigeminadas, polimorfas e polifocais. Arritmias fatais são raras, existindo poucos casos de morte súbita, provavelmente relacionados a arritmias ventriculares. O mecanismo da toxicidade cardíaca atribunido aos Sb^{v} é desconhecido e por isso não são indicados, ou possuem indicação limitada em cardiopatas e nefropatas (56).

Na região amazônica, a eficácia do antimoniato de meglumina é baixa e da pentamidina tem sido indicada como droga de primeira escolha. Trata-se de um derivado sintético da amidina, eficaz contra grande número de protozoários patogênicos, incluindo espécies de

Leishmania. A descoberta da atividade antiprotozoária das diamidinas foi consequente a procura por compostos hipoglicemiantes que pudessem comprometer o metabolismo energético de parasitas. Atualmente, e comercializada para uso humano apenas sob a forma liofilizada de isotionato de pentamidina, em frascos contendo 300 mg do sal. O mecanismo de ação da pentamidina ocorreria por inibiçao de diferentes processos celulares, ainda não totalmente elucidados. Recentemente, resistencia a pentamidina tem sido descrita em tripanossomas e leishmanias.

Estudos revelam que enquanto a taxa de cura do CL causado por *L. guyanensis* com antimônio versus pentamidina em dose única de 4mg/ Kg/peso foram semelhantes, 58,1% e 55,5% respectivamente (63), a pentamidina aplicada na dose de 7mg/Kg/peso, em 3 doses, teve uma taxa de cura de 96,2% (64). Apesar da eficácia e recomendação do MS, o uso intra hospitalar da pentamidina dificulta o acesso e a adesão ao tratamento de muitos pacientes.

Outra opção terapêutica no tratamento da LC é a anfotericina B(AB), um antibiótico macrolideo poliênico, que interage com o ergosterol da membrana celular, formando poros que alteram a permeabilidade celular e o balanco ionico, causando a morte da celula. É considerada a droga de segunda escolha quando não se obtem resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente ou na impossibilidade de seu uso. E contraindicada a administracao da anfotericina B em cardiopatas, hepatopatas e, especialmente, nefropatas, exceto para as formas lipossomais. Os efeitos adversos mais frequentes sao febre, nauseas, vomitos, hipopotassemia e flebite no local da infusão (41).

Em Manaus, capital do estado do Amazonas, estudo recente verificou que em pacientes portadores de *Leishmania (V.) guyanensis*, a eficácia do Sbv no tratamento da LC é baixa, com 58,1% de taxa de cura (35).

A miltefosina é uma alquilfosfocolina, análogo da fosfotidilcolina, originalmente utilizada como antineoplásica, por suas propriedades antiproliferativas em células tumorais particularmente no tratamento do câncer de mama metastático. O potencial da atividade

leishmanicida da Miltefosina iniciou em 1980 quando estudos em murinos mostratam a interferência da droga no metabolismo de promastigotas de *Leishmania donovani* (65). Estudos posteriores, testaram o medicamento por via oral em camundongos *Balb/c,* inoculados com *L. donovani e L. Infantum* e obtiveram bons resultados*. Estes resultados estimularam o desenvolvimento de protocolos para o tratamento da LV, na Índia.* Foi a primeira droga oral com eficácia comprovada para o tratamento da leishmaniose visceral (41). Postula-se que a medicação atua induzindo apoptose celular e module o sistema imune por meio da ativação macrofágica (41). Em estudos, in vitro, contra promastigotas e amastigotas de *L. donovani*, atua bloqueando o citocromo C oxidase que leva a alteração no potencial da membrana mitocondrial e, consequentemente, reduz o consumo de oxigênio e produção de ATP pelos parasitas. Além disso, inibe a enzima fosfatidilétanolamina n-metil-transferase, responsável pela biossíntese da fosfatidilcolina.

Outro efeito da medicação é a abertura de canais de cálcio da membrana plasmática e efeito direto nos acidocalcisomas que resultam em grande acúmilo de cálcio intracelular (66). Além dos efeitos no metabolismo da membrana celular, a miltefosina acentua a citotoxicidade dos macrofagos, causando a morte do parasito na célula, pelo estímulo do estresse oxidativo dos macrófagos e produção de produtos reativos do oxigenio como H2O2 e superzindo O2, além de induzir a produção e liberação de interferon-gama, principal citocina para a atividade macrofágica (41).

Lux et al. (67) mostraram que a síntese de lipofosfoglicano (LPG) e glicoproteína 63 (gp63) encontra-se inibida em parasitas tratados com este fármaco. É possível que este fármaco também induza apoptose nos parasitas e altere as vias de sinalização cellular (68).

Em humanos, a biodisponibilidade absoluta, assim como a depuração (*clearance*) e o volume de distribuição não foram determinados até o momento, pelo fato da miltefosina possuir atividade hemolítica e, portanto, não poder ser administrada por via endovenosa (69). A miltefosina é absorvida, lentamente, no trato gastrintestinal. Apresenta a meia vida plasmática inicial é de uma semana e a meia vida plasmática terminal é de quatro semanas (70).

Estudos recentes (48,56,71) (4)(10)(9) indicam que a miltefosina, administrada por via oral é a droga com maior eficácia para o tratamento de pacientes com LC ocasionada por *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* em nível ambulatorial.

Machado et al. (71) mostraram taxa de cura de 81,7% de LC com o uso da miltefosina comparado a de apenas 60% no grupo tratado com antimonial. Dado semelhante foi observado no ensaio clínico com miltefosina em pacientes com LC por *L. (V.) guyanensis* em Manaus, onde a taxa de cura final com 6 meses foi de 71,4% no grupo tratado com miltefosina comparado com 53,6% no grupo que usou Sbv (48).

Os principais efeitos adversos relatados com o uso da miltefosina são os relacionados ao tratao gastrointestinal como náuseas, vômitos e dor abdominal (48,71). Outras reações como elevação leve e transitória das enzimas hepáticas e da creatinina sérica são comumente reportadas (72).

O uso da poliquimioterapia no tratamento de doenças causadas por agentes intracelulares, a exemplo da tuberculose, hanseníase e leishmaniose, é indicada há muito tempo. Existem evidências de que tanto na leishmaniose cutânea como mucosa a lesão tecidual está predominantemente relacionada à resposta imune do hospedeiro do que a uma ação citotóxica do parasito. Estudos mostram que ativação de células T e a frequência de células T expressando TNF ou IFN se associam com o tamanho da úlcera leishmaniótica (Todos trabalhos com GM-CSF) e o uso de agentes imunomoduladores tem sido utilizado como coadjuvantes no tratamento (56,73–75).

O GM-CSF é um fator de crescimento de células pluripotentes da medula óssea, com capacidade de estimular tanto a resposta imunológica de linfócitos Th1 quanto Th2 (15) (76). As principais células ativadas por GM-CSF são os macrófagos que são estimuladas a proliferar na medula óssea, migrar até o tecido infectado e exercer sua atividade fagocítica e de apresentação de antígenos (73).

In vitro, o GM-CSF mostrou potencializar a atividade leishmanicida dos macrófagos. Estudos para testar sua atividade antimicrobiana demonstratam que ocorre a ativação de granulócitos neutrófilos e células *natural Killers,* induzindo a liberação de metabólitos citotóxicos. Adicionalmente à sua atividade antimicrobiana, o GM-CSF tem a capacidade de estimular a atividade de fibroblastos promovendo a fibrogênese e cicatrização de feridas (37,73,74).

Com relação ao mecanismo imunomodulatório do GM-CSF foi demonstrado que uma linhagem de macrófagos produzem interleucina (IL) - 10 na presença de GM-CSF . Pacientes com LC localizada produzem altos níveis de interferon-g e fator de necrose tumoral (TNF) -α que são importantes para matar o parasita. Contudo, essas citocinas podem ser liberadas em excesso e podem ser responsáveis pela intensa resposta inflamatória e dano tecidual. GM-CSF pode induzir a liberação dessas citocinas, mas também podem induzir IL-10, que poderia modular o resposta inflamatória e dano tecidual causado pelas citocinas pró-inflamatórias (77).

Recentemente, mostrou-se que monócitos de pacientes usando miltefosina mais GM-CSF aumentou a liberação de espécies reativas de oxigênio, a capacidade de matar leishmania e aumentou a proliferação de células CD4 e CD8 (78). O GM-CSF associado ao antimonial tanto por via subcutânea como por via tópica mostrou-se mais eficaz que o antimonial em monoterapia, reduzindo o tempo de tratamento da LC e curando pacientes refratários ao antimonial (73,75)

As diferentes espécies de *Leishmania* apresentam respostas terapêuticas distintas a um mesmo medicamento (48,49) (4,18). Atualmente as medicações disponíveis para o tratamento de LC incluem medicamentos cujo uso torna-se limitado pelo potencial de toxicidade, baixa eficácia, via parenteral exclusiva de administração das drogas, o que dificulta a adesão e a regularidade do tratamento, especialmente por moradores da zona rural, que enfrentam dificuldades de acesso a serviços de saúde.

Neste contexto, impõe-se a necessidade de estudos que proponham desenvolver

tratamentos mais efetivos e por via oral com o objetivo de aumentar a taxa de cura, diminuir a morbidade e o absenteísmo causados pela doença, além de diminuir o custo e facilitar a adesão do paciente ao tratamento.

2. OBJETIVOS

Geral

Avaliar a eficácia e a efetividade da associação miltefosina com fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) no tratamento da LC.

Específicos

Avaliar se a associação do GM-CSF aumenta a taxa de cura da miltefosina.

Avaliar se a associação do GM-CSF com miltefosina reduz o tempo de cicatrização das lesões de LC.

Identificar a taxa de infecção por *L.guyanensis* e demais espécies causadoras da doença nos casos atendidos.

Avaliar a incidência e gravidade dos efeitos colaterais das medicações.

3. PRODUTO DA TESE

O produto dessa tese foi publicado na revista "*International Journal of Infectious Diseases*" sob título: "Association of Miltefosine with Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in the Amazon Region: a randomized and controlled trial" DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.11.183

Journal Pre-proof

Association of Miltefosine with Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in the Amazon Region: a randomized and controlled trial

Luciana Mendes, Jorge Oliveira Guerra, Bleno Costa, Aríneia Soares da Silva, Maria das Graças Barbosa Guerra, Jéssica Ortiz, Susan Smith Doria, George Villarouco da Silva, Denison Vital de Jesus, Manoel Barral-Netto, Gerson Penna, Edgar M. Carvalho, Paulo R.L. Machado

PII: S1201-9712(20)32496-6

DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.11.183

Reference: IJID 4893

To appear in: *International Journal of Infectious Diseases*

Received Date: 15 October 2020

Revised Date: 17 November 2020

Accepted Date: 21 November 2020

Please cite this article as: { doi: https://doi.org/

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 Published by Elsevier.

Association of Miltefosine with Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in the Amazon Region: a randomized and controlled trial.

Luciana Mendes[a,b], Jorge Oliveira Guerra[a], Bleno Costa[b], Aríneia Soares da Silva[a], Maria das Graças Barbosa Guerra[a], Jéssica Ortiz[a], Susan Smith Doria[a], George Villarouco da Silva[a], Denison Vital de Jesus[a], Manoel Barral-Netto[c], Gerson Penna[d], Edgar M. Carvalho[c,e,f], Paulo R. L. Machado[e,f*].

[a] Programa de Pós graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas/Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado-UEA/FMTHVD, Manaus, Amazonas, Brazil.

[b] Universidade Federal do Amazonas, Brazil.

[c] Instituto Gonçalo Moniz (IGM), FIOCRUZ, Bahia, Brazil.

[d] Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília (UnB), Brasília-DF, e Escola Fiocruz de Governo, Fundação Oswaldo Cruz Brasília, Brazil.

[e] Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

[f] Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, CNPq, Brasília, DF, Brazil.

Abstract

Objectives: To compare topical GM-CSF and miltefosine (G+M) *versus* placebo and miltefosine (P+M) or parenteral meglumine antimoniate (MA) in the treatment of 150 patients with cutaneous leishmaniasis (CL) caused by *Leishmania guyanensis* in the Amazon.

Design: A randomized and double-blinded clinical trial.

Results: At 90 days after initiation of therapy the cure rates were 66%, 58% and 52% for the groups P+M, G+M, and MA respectively ($p > 0.05$). Cure rates at 180 days did not differ. Healing time was similar in the 3 groups, but faster in the MA group compared to the G+M group ($p = 0.04$). Mild and transitory systemic adverse events were frequent in all groups (above 85%). Nausea (85%) and vomiting (39%) predominated in the miltefosine groups; arthralgia (51%) and myalgia (48%) in the MA group. One patient (group MA) stopped treatment after presenting fever, exanthema, and severe arthralgia.

Conclusions: Miltefosine did not present a higher cure rate than MA, and the association of GM-CSF did not improve the therapeutic response. Nevertheless, due to its less toxicity, easier administration, and a similar cure rate when compared with MA, miltefosine should remain as one of the main drugs for treating CL due to *L. guyanensis*. (Clinicaltrials.gov Identifier NCT03023111).

Key Words: cutaneous leishmaniasis; GM-CSF; miltefosine; meglumine antimoniate; *L. guyanensis*.

Introduction

Different species of leishmania cause leishmaniasis in Brazil but *L. braziliensis* and *L. guyanensis* are responsible for the majority of cases of tegumentary leishmaniasis (TL), that may affect skin and mucosal, being the most common in the latter group the nasal mucosa (Amato et al. 2007). TL is composed by distinct clinical forms as cutaneous leishmaniasis (CL), mucosal leishmaniasis (ML), disseminated leishmaniasis (DL) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). In the Amazon region *L. guyanensis* is the main causal agent of TL, while *L. braziliensis* predominate in the other regions (De Guerra et al. 2015). The cutaneous ulcer is the main characteristics of CL but the disease is more severe in patients infected by *L. braziliensis* than *L. guyanensis* (Romero et al. 2001). CL caused by *L. braziliensis* presents positive lymphoproliferative responses and higher IFN- production but infections by L. *guyanensis* seems to induce a down-regulation of the immune system allowing continuous parasite replication (Matta et al. 2009). While in CL due to *L. braziliensis* absence or scarce number of amastigotes forms are detected, the parasite burden in CL caused by *L. guyanensis* is high and amastigotes are easily observed in material obtained by scarification of the lesion border (Romero et al. 2001). The initial clinic manifestation in both diseases is a papular or nodular lesion, but while a huge satellite lymph node is found in disease caused by *L. braziliensis*, adenomegaly is small in CL caused by *L. guyanensis* (Romero et al. 2001). Moreover the ulcer in *L. braziliensis* are more well-limited and the borders are more raised than in *L. guyanensis* infection (Romero et al. 2001).

Therapy for CL range from topical to systemic; for instance, local heat therapy is associated with high efficacy in CL in the Old World (Sadeghian et al. 2007), but limitations such as the size of the ulcers, lesions in the face and risk to the disease progress to ML in areas of *L. braziliensis* transmission indicates systemic intervention (Llanos-Cuentas et al. 1984;

Blum J et al. 2012). Pentavalent antimony was first used over 70 years ago, but it is still the main therapy for CL in South and Central America.

The recommended therapy for CL in Brazil is meglumine antimoniate, but the response is quite variable dependent of the species of the leishmania and the region where the disease is documented. For instance, in the Southeast and in the Northeast of Brazil, *L. braziliensis* is the main causal agent of CL but while response to therapy is observed in more than 90% of the patients in the Rio de Janeiro state (Saheki et al. 2017), the cure rate range from 48 to 60% in the endemic area of Corte de Pedra in Bahia (Machado et al. 2010; Prates et al. 2017).

In the Amazon region the efficacy of meglumine antimoniate is low and pentamidine has been used as the first choice drug. While the cure rate of CL caused by *L. guyanensis* with antimony versus pentamidine in a single dose of 4mg/Kg/weight were similar, 58.1% and 55.5% respectively (Neves et al. 2011), pentamidine (7mg/Kg/weight) applied in 3 doses had a cure rate of 96.2% (Gadelha et al. 2018).
Both meglumine antimoniate and pentamidine have high rate of adverse reactions which are dose dependent (Chrusciak-Talhari et al. 2011; Gadelha et al. 2015).

Considering all the challenges involved in CL therapy, the development of new drugs and strategies is an important issue in CL regardless of the species and country. Miltefosine acts by blocking cytochrome C oxidase which results in changes in mitochondrial membrane potential, reducing oxygen consumption and ATP levels in *L. donovani* (Luque-Ortega and Rivas, 2007). Additionally it also inhibit phosphatidylethanolamine N-methyl-transferase and consequently the biosynthesis of phosphatidylcholine (Rakotomanga et al. 2007). Miltefosine also increases phagocytosis and induces IFN-γ production, the most important cytokine that activate macrophages to kill Leishmania (Jha et al. 1999; Wadhone et al. 2009; Ponte et al. 2012). We have previously shown in CL caused by *L. guyanensis* that the cure rate with miltefosine (71.4%) was higher than with meglumine antimoniate (51.6%) (Chrusciak-Talhari et al. 2011). There are also evidences that intra lesional or subcutaneous administration of GM-CSF enhances the cure rate of CL treated with

meglumine antimoniate (Santos et al. 2004; Almeida et al. 2005). GM-CSF enhances phagocytosis and leishmania killing (Shi et al. 2006). Recently we show that monocytes from patients using miltefosine plus GM-CSF increased the respiratory burst, the ability to kill leishmania and increased proliferation of CD4 and CD8 cells (Peixoto et al. 2020).

The present study is part of a multicentric project aimed to determine if the combination miltefosine with GM-CSF enhances the cure rate of CL caused by *L. braziliensis* or *L. guyanensis*. Here we show data from a clinical trial comparing miltefosine plus GMCSF versus miltefosine plus placebo versus meglumine antimoniate in the treatment of CL caused by *L. guyanensis*.

Patients and Methods

Type of Study, Case Definition and Study population

A randomized placebo-controlled trial with 3 groups of CL patients comparing the efficacy of oral miltefosine combined with topical placebo (M+P), oral miltefosine combined with topical GM-CSF (M+GM) and intravenous meglumine antimoniate (control group). The study was registered at clinicaltrials.gov under NCT03023111. CL was defined by the presence of at least one ulcerated lesion in any part of the body, with documentation of the presence of Leishmania amastigotes in the slit skin smears obtained from the borders. This study included 150 CL patients and was conducted from June 2018 through February 2020 at the dermatology outpatient clinics of Heitor Vieira Dourado Tropical Medicine Foundation (FMT-HVD) in Manaus, Amazon State.

The majority of patients (83%) came from endemic areas located in the rural and suburban areas of Manaus municipality, 14.6% from other municipalities and 2% from other states (Rondonia and Mato Grosso).

Study Design

The inclusion criteria were age from 18 to 65 years, one to five ulcers ranging from 10 to 50mm of diameter, deviation of illness between 30 to 90 days, with no previous treatment. Exclusion criteria were evidence of chronic diseases, patients with diagnosis of HIV or in use of immunosuppressive drugs, pregnancy or breastfeeding mothers, women in the fertile age who did not accept to use parenteral contraceptive and subjects with no ability to understand or no desire to sign the informed consent.

Patients were randomized according to a computer list obtained in www.randomization.com and allocated at a ratio of 1:1 into 3 groups, each with 50 patients. The group 1 was treated with miltefosine (ImpavidoTM, Paesel + Lorei, Rheinberg, Germany) at a dose of 2.5mg/Kg of body weight (maximum daily dose of 150mg), 3 times a day for 28 days plus placebo (polycarbophil gel twice a day per 28 days). The group 2 was treated in the same dose of miltefosine plus topical GM-CSF (polycarbophil gel 0.01%, twice a day per 28 days). Patients were instructed to clean the ulcers with water and soap before applying the gel. Both the topical GM-CSF and placebo were produced by the 4G Company, Porto Alegre, Brazil. The group 3 was treated with meglumine antimoniate (GlucantimeR, Sanofi-Aventis) in the daily dose of 20mg/Kg by intravenous route once a day for 20 days. Women in childbearing age were included only after a negative beta HCG test to excluded pregnancy and used a parenteral contraceptive during 3 months.

The rhGM-CSF was purified according to Schwanke et al 2009. Ointments were prepared on 1.5% (w/w) aqueous polycarbophil gel containing 10 µg/g of rhGM-CSF. Placebo was prepared on the same way, without the rhGMCSF. This concentration was the same used in our previous trials (Santos et al. 2004; Almeida et al. 2005), and we have decided to use this different application formula and schedule to facilitate adherence and avoid additional visits to the clinics.

Laboratory Procedures

1. Identification of amastigotes in tissue

Skin fragments were collected from the border of the ulcer by scarification and the smear was visualized by optical microscopy by Giemsa stain. Skin biopsies were performed in the lesion border by 4mm punch. The material was divided in two parts being half used for culture in the NNN medium and half added to RNAlater solution for PCR.

2. PCR for determination of Leishmania species

DNA extraction was performed using a commercial Quiagen® kit and molecular identification was performed from the Polymerase Chain Reaction (PCR), with the help of the primers described by Marfurt et al. (5'-TAT TGG TAT GCG AAA CTT CCG-3' and 5'-ACA GAA ACT GAT ACT TAT ATA GCG-3') (REF). The DNA solution was amplified in a final volume of 25µl, containing 10x PCR Buffer; 50Mm Mgcl; 50Mm of Fme; 50Mm of Rme; 10mM of DNTPs; 2U of Taq polymerase. The PCR conditions were 5 min at 94 ° C followed by 40 cycles of 30 seconds at 94° C, 15 seconds at 55° C and 10 seconds at 72° C, finally, a single 5 minute cycle at 72° C The PCR products were separated on a 2% agarose gel. The PCR product will then be sequenced in an ABI 3730 analyzer (Applied Biosystems), and the sequences will be identified by Genbank's BLAST tool.

3.*Laboratorial exams.*

All patients had blood taken on day 0 and 30 days to perform haemogram, urea, creatinine, blood sugar levels, transaminases (AST and ALT) and amilase.

Evaluation of Response to Therapy

Cure was defined by healing of the ulcers with complete reepithelization in the absence of infiltration of the borders at 90 (primary cure) and 180 (final cure) days after the initiation of treatment. Patients who fail to therapy on day 90 were treated with meglumine antimoniate in the doses of 20mg/Kg for 30 days.

Statistical Analysis

The data will normal distribution were presented by means and standard/deviation and were analyzed by Student T test. Categorical data without normal distribution were presented by median and interquartile and were analyzed by the Kruskal-Wallis. The proportions were analyzed by the Chi square test of Pearson. The Kaplan-Meyer survival cure was analyzed by Log rank test for trend. The intention to treat analysis (ITT) was used to determine the cure rate. The statistical analyses were performed by STATA, V.13, MP. A value of $P<0.05$ was considered statistically significant.

Results

The majority of the 150 CL subjects were male (84% of cases), with age ranging from 18-65 years, presented with one ulcer (80%) localized mainly in lower limbs in 44.6% of cases and also in upper limbs (41.3%). These data did not differ according to treatment groups. Demographic and clinical and laboratorial data are shown on table 1. Ulcers were characterized by round shape, flattened erythematous borders, and granulous or crusted superficial center; size ranging from 30 to 105 mm2 without differences between groups. Satellite lymph nodes with less than 1cm of diameter were detected in 42% of patients in subjacent skin near ulcerations; small satellites papules near the ulcer were found in 28%. All patients had a positive direct skin slit smear showing many amastigotes in the cutaneous tissue. A positive culture for Leishmania sp. was obtained in 83% of subjects, and PCR for *L. guyanensis* was positive in 94% of the cases.

Patients were followed up monthly for 90 days and also at 180 days after starting treatment. Seven losses were documented: one due to a severe adverse event (AE) in the Sbv group; six subjects did not return to follow up, two from group 3 (meglumine antimoniate), and four from group 1 (M+P).Cure rates at 90 days were 66%, 58% and 52% for groups M+P, M+GM and meglumine antimoniate respectively ($p>0.05$). The cure rates at 180 days were the same for the first two groups and dropped to 50% for the meglumine antimoniate group (table 3). Cure rates paired analyses comparing two groups each time did not show any significant differences for 90 and 180 days.

The healing time in days was similar between the three groups (figure 1, Kaplan-Meyer Curve), ranging from 45 ± 22, 48 ± 24, and 37 ± 14 for groups M+P, M+GM and meglumine antimoniate respectively. Paired analysis comparing two groups each time showed a faster healing time in the control group when compared to the group treated with Miltefosine + GM-CSF (p = 0.04).

Mild and transitory systemic AEs were recorded in up to 97% of patients using Miltefosine. The most common were nausea and vomiting (85% and 39% respectively) in the first days of therapy and no irregular use was reported. All patients were advised to use ondansetron 4mg when necessary. In the control group 86% of cases present AEs: arthralgia in 51% and myalgia in 48% were the most common. AEs in the three groups are showed in table 3. One subject in the meglumine antimoniate group had to stop medication due to a severe AE, with fever, exanthema, intense arthralgia and elevation of amilase four times the reference value.

Table 1 – Demographic, Clinical Features and Laboratorial of 150 Cutaneous Leishmaniasis Patients from the Amazonia Region

Variables	**Group**			
	Miltefosine + Placebo (N = 50)	**Miltefosina + GM-CSF (N = 50)**	**Sb^{v} (N = 50)**	**p-valor**
Age, Median (Years)	39 (27-50)	40 (29-48)	42 (27-50)	>.05*
Male / Female ratio	44 / 6	44 / 6	38 / 12	>.05*
Illness duration, Median (Days)	30 (30-45)	30 (30-60)	30 (30-45)	>.05*
Site of the lesion [%]				
Head / Neck	4 (8)	3 (6)	0	<.05**
Trunck	7 (14)	2 (4)	5 (10)	
Uper limbs	12 (24)	25 (50)	25 (50)	
Lower limbs	27 (54)	20 (40)	20 (40)	
Highest lesion size, Median (mm^2)	55 (30-105)	55.1 (30-100)	50 (30-105)	>.05*
Number of lesions				
1 lesion [%]	38 (76)	41 (82)	41 (82)	>.05*

2 or more lesions [%]	12 (24)	9 (18)	9 (18)	
Satellite lymph node [%]	19 (41)	22 (44)	22 (44)	
Positive PCR [%]				
L. guyanensis	38(76)	39(78)	45(90)	>.05**
L. brasiliensis	2(4)	3(6)	1(2)	
L. naiffi	3(6)	2(4)	0	

**Data represents Means ± DP or Medians (Interquartile ranges), Student test or Kruskal-Wallis rank test.*
***Data represents proportions (Chi square test).*

Table 2 – Cure Rate of Cutaneous Leishmaniasis Patients from the Amazonia Area Treated With Miltefosine Plus Placebo, Miltefosine Plus GM-CSF and Meglumine Antimoniate With Intend of Treatment

	Groups			
Response to Therapy	Miltefosina + placebo (N = 50)	Miltefosina + GM-CSF (N = 50)	Sb^v (N = 50)	P value
Cure on Day 60	27 (54)	28 (56)	27 (54)	>.05*
Cure o Day 90	33 (66)	29 (58)	26 (52)	>.05*
Cure on Day 180 (%)	33 (66)	29 (58)	25 (50)	>.05*
Relapses (%)	0	0	1 (2)	>.05*
Healing time in days (Median)	45 (25-50)	46 (28-60)	40 (20-50)	>.05**

* *Data represents proportions (Chi square test).*
** *Data represents mean ± SD, Student test or Kruskal-Wallis rank test.*

Table 3 – Frequency of Adverse Reactions in Patients Treated with Miltefosine or Meglumine Antimoniate

	Groups		
Variables	**Miltefosine [N = 97]**	**Sb^v [N = 49]**	**P value**
Headache	20 (21)	16 (32,6)	>.05
Fever	9 (9)	11 (22,4)	>.05

Artralgia	12 (12,3)	25 (51)	<.01
Mialgia	14 (14,4)	21 (42,8)	<0.001
Nausea	83 (85,5)	9 (18,3)	<.001
Vomit	38 (39,1)	6 (12,2)	<0.01
Others	42 (43,2)	25 (51)	>.05
None	3 (3)	7 (14,2)	<.05

Data represents proportions, Chi square test.

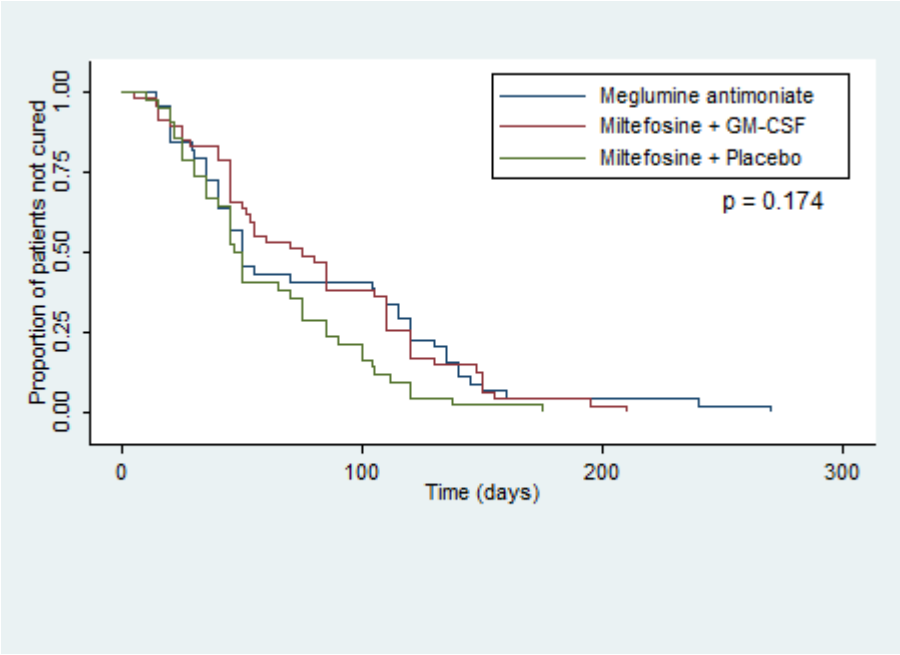


Figure 1 Kaplan Meyer curve showing proportion of patients not cured.

Discussion

CL is predominantly caused by *L. guyanensis* in the Amazon region (De Guerra et al. 2015). The increasing deforestation of the urban area in periphery of Manaus, the capital of the Amazonas State, with the settlement of houses close to the fragment of forests, has contributed to an increase in the number of cases in this municipality (Chagas et al. 2018). Therefore, identification of new drugs is necessary to improve the cure rate, decrease the high healing time, reducing the absenteeism and stigmatization.

Although in an recent open trial, pentamidine in three weekly doses of 7mg/kg was associated with a high cure rate (Gadelha et al., 2018), its parenteral use requiring further visits to the clinics indicates the need for more practical therapeutic strategies, including oral drugs.

In a recent study we showed that the cure rate with miltefosine was higher than antimony in the treatment of CL due to *L. guyanensis* (Chrusciak-Talhari et al. 2011).

Furthermore, in CL caused by *L. braziliensis* we have shown that topical GM-CSF associated to meglumine antimoniate enhances the cure rate of CL when compared with meglumine antimoniate plus placebo (Santos et al. 2004). In an attempt to improve the cure rate of CL due to *L. guyanensis* we performed this clinical trial aimed to determine if miltefosine plus GM-CSF would be more effective than monotherapy with miltefosine or meglumine antimoniate. In the present study the cure rate in the 3 groups of the study were similar.

In a clinical trial aimed to compare the response to therapy between different groups it is important that patients had similar characteristics, as there are host factors associated with more or less response to therapy. The main risk factors for failure therapy in CL are age, as children have a greater failure rate (Suprien et al. 2020), size of the largest lesions and more than 1 lesion (Llanos-Cuentas et al. 2007; Blum et al. 2012). Here there were no differences among the 3 groups regarding these specific variables. Others have found that CL characterized by satellite papules around the ulcer are associated with treatment failure (Chrusciak-Talhari et al. 2011). However we did not find this association in the present trial.

The intention to treat analysis did not show difference in the response to therapy between the groups. The group that uses miltefosine plus placebo or GM-CSF had a higher rate of cure compared to meglumine antimoniate but this difference did not achieved significance. The end points were cure on day 90 and on day 180 for initial and final cure respectively. The results were similar at these 2 times points indicating the cure on day 90 may be used as the end point for responses to therapy in future studies. As it is important to reduce the healing time of CL we also compared the cure rate on day 60 but no difference were observed among the groups. The healing time did not show difference among the groups but patients treated with miltefosine plus GMCSF had a higher healing time than patients treated with meglumine antimoniate. In addition to increasing phagocytes and leishmania killing, GM-CSF down modulate the immune response by enhancing IL-10 levels (Matta et al. 2009).

In *L. braziliensis* infection an exaggerated inflammatory response is associated with pathology and IL-10 may benefits therapy (Matta et al. 2009). However as in CL due to *L. guyanensis* there is a low lymphocyte proliferation, high expression of Il-10 and a T cell response toward a type 2 cytokines, it is possible that these differences in the immune response may explain the lack of efficacy of GM-CSF in improve the miltefosine cure rate. Another possible explanation for GM-CSF failure could be a possible low penetration and action due to the formulation and schedule used in this trial, that differ from the ones used in previous studies (Santos et al. 2004; Pacheco et al., 2005). However, immunological data from subjects using topical GM-CSF in this trial showed a higher ability of monocytes to kill leishmania and an increased proliferation of CD4 and CD8 when compared with the placebo group, indicating that GM-CSF was absorbed and had systemic effects (Peixoto et al. 2020). Despite therapy for CL taking less than 30 days, the healing time in the majority of the patients is only observed after 60 days from the initiation of therapy. Here we evaluate by Kaplan-Meier the healing time of not cured patients and despite a trend of the group M+P have a short cure time than the others, no difference among the groups was documented.

Adverse reactions are a major problem for therapy of CL. Pentavalent antimony (meglumine antimoniate) is often associated with myalgia and arthralgia, and these manifestations may be severe, imposing interruption of the treatment as observed in one of our cases. Moreover the need of a parenteral route for the application of the drug decreases the adhesion to the treatment due to the limitations to access to the Health Posts. Miltefosine is known to cause nausea and vomits (Machado et al. 2010; Chruskiasky-Talhari et al. 2011). We have found that the preventive use of ondansetron contributed to a better control of these symptoms, as none of the patients using miltefosine have discontinued treatment due to it. Occurrence of herpes zoster has been reported in CL patients treated with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate (Wortmann et al. 1998; Arboleda et al. 2013). In this trial, herpes zoster was also documented in the trunk of 3 patients in the meglumine group, who presented good and quick response to systemic acyclovir.

This study showed that miltefosine did not presented a higher cure rate than meglumine antimoniate, and the association of GM-CSF did not improve the therapeutic response to miltefosine. Nevertheless, due to its less toxicity and easier administration, along with a similar cure rate when compared with meglumine antimoniate, miltefosine should remain as one of the main drugs for the treatment of CL due to *L. guyanensis*.

Ethical Approval

This project was developed according to international ethical guidelines for biomedical research involving human beings (Resolution 466/12 CNS, 2012) and was approved by the Ethics Committee of the Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado (CAAE 80862417.3.0000.0005).

cure rat

Conflict of Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

The funding source of this trial was the Ministry of Health of Brazil.

References

Almeida RP, Brito J, Machado PL, De Jesus AR, Schriefer A, Guimarães LH, et al. Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. Am J Trop Med Hyg. 2005;73(1):79-81.

Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: Systematic review. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(2):266 74.

Arboleda M, Jaramillo L, Ortiz D, Díaz A. Leishmaniasis cutánea y herpes zoster multidermatómico [Cutaneous leishmaniasis and multidermatomic herpes zoster]. ver Chilena Infectol. 2013;30(6):680-2.

Blum J, Lockwood DN, Visser L, Harms G, Bailey MS, Caumes E, et al. Local or systemic treatment for New World cutaneous leishmaniasis? Re-evaluating the evidence for the risk of mucosal leishmaniasis. Int Health. 2012;4(3):153-63.

Chagas ECDS, Silva AS, Fé NF, Ferreira LS, Sampaio VDS, Terrazas WCM, et al. Composition of sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) and detection of Leishmania DNA (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in different ecotopes from a rural settlement in the central Amazon, Brazil. Parasites and Vectors. 2018;11(1):1–10.

Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Talhari CC, Da Silva RM, Yamashita EPG, De Oliveira Penna G, et al. Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of 16

miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) guyanensis in Manaus, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2011;84(2):255–60.

De Guerra JAO, Maciel MG, De Guerra MVF, Talhari AC, Prestes SR, Fernandes MA, et al. Tegumentary leishmaniasis in the state of amazonas: What have we learned and what do we need? Rev Soc Bras Med Trop. 2015;48(December 2013):12–9. Gadelha EP, Talhari S, Guerra JA, Neves LO, Talhari C, Gontijo B, et al. Efficacy and safety of a single dose pentamidine (7mg/kg) for patients with cutaneous leishmaniasis caused by L. guyanensis: a pilot study. An Bras Dermatol. 2015 Nov-Dec;90(6):807-13. doi: 10.1590/abd1806-4841.20153956. PMID: 26734860; PMCID: PMC4689067.

Gadelha EPN, Ramasawmy R, da Costa Oliveira B, Morais Rocha N, de Oliveira Guerra JA, Allan Villa Rouco da Silva G, et al. An open label randomized clinical trial comparing the safety and effectiveness of one, two or three weekly pentamidine isethionate doses (seven milligrams per kilogram) in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the Amazon Region. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(10):1–13.

Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Bachmann P, Karbwang J, Fisher C, et al. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian viceral leishmaniasis. N Engl J Med. 1999;341(24):1785-800.
Llanos-Cuentas EA, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC, Campos M. Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. Lancet. 1984; 2(8397):295.

Luque-Ortega JR, Rivas L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in Leishmania donovani promastigotes. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(4):1327–32.

Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by leishmania 17braziliensis in Brazil: A randomized and controlled trial. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(12):1–6.

Matta NE, Nogueira RS, Franco AMR, De Souza E Souza I, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, et al. Leishmania (Viannia) guyanensis induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the Brazilian Amazon highland. Am J Trop Med Hyg. 2009;80(3):339–44.

Neves LO, Talhari AC, Gadelha EPN, da Silva RM, Guerra JA de O, Ferreira LC de L, et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por Leishmania guyanensis. An Bras Dermatol. 2011;86(6):1092–101.

Peixoto F, Nascimento MT, Costa R, Silva J, Renard G, Guimarães LH, et al. Evaluation of the Ability of Miltefosine Associated with Topical GM-CSF in Modulating the Immune Response of Patients with Cutaneous Leishmaniasis. J Immunol Res. 2020; 6:2789859.

Prates FV, Dourado ME, Silva SC, Schriefer A, Guimarães LH, Brito MD, et al. Fluconazole in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania braziliensis: A Randomized Controlled Trial. Clin Infect Dis. 2017;64:67-71.

Ponte CB, Alves ÉAR, Sampaio RNR, Urdapilleta AAA, Kückelhaus CDS, Muniz-Junqueira MI, et al. Miltefosine enhances phagocytosis but decreases nitric oxide production by peritoneal macrophages of C57BL/6 mice. Int Immunopharmacol [Internet] 2012;13(1):114–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2012.03.016.

Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PM. Miltefosine affects lipid metabolism in Leishmania donovani promastigotes. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(4):1425–30.

Romero GAS, De Farias Guerra M V., Paes MG, De Oliveira Macêdo V. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania (Viannia) braziliensis and L. (V.) guyanensis in Brazil: Clinical findings and diagnostic approach. Clin Infect Dis. 2001;32(9):1304–12.

Sadeghian G, Nilfroushzadeh MA, Iraji F. Efficacy of local heat therapy by radiofrequency in the treatment of cutaneous leishmaniasis, compared with intralesional injection of meglumine antimoniate. Clin Exp Dermatol. 2007;32(4):371-4.

Saheki MN, Lyra MR, Bedoya-Pacheco SJ, Antônio LF, Pimentel MIF, Salgueiro MM, et al. Low versus high dose of antimony for American cutaneous leishmaniasis: A randomized controlled blind non-inferiority trial in Rio de Janeiro, Brazil. PLoS One. 2017; 30;12(5):e0178592.

Santos JB, de Jesus AR, Machado PR, Magalhães A, Salgado K, Carvalho EM, 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. 2004;190:1793-6.

Schwanke RC, Renard G, Chies JM, Campos MM, Batista EL Jr, Santos DS, et al. Molecular cloning, expression in Escherichia coli and production of bioactive homogeneous recombinant human granulocyte and macrophage colony stimulating factor. Int J Biol Macromol. 2009; 45(2):97-102.

Shi Y, Liu CH, Roberts AI, Das J, Xu G, Ren G, et al. Granulocyte-macrophage colonystimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: What we do and don't know. Cell Res. 2006;16(2):126–33.

Suprien C, Rocha PN, Teixeira M, Carvalho LP, Guimarães LH, Bonvoisin T, et al. Clinical Presentation and Response to Therapy in Children with Cutaneous Leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2020;102:777-81.

Wadhone P, Maiti M, Agarwal R, Kamat V, Martin S, Saha B. Miltefosine Promotes IFN-γ-Dominated Anti-Leishmanial Immune Response. J Immunol. 2009;182(11):7146–54.

Wortmann GW, Aronson NE, Byrd JC, Grever MR, Oster CN. Herpes zoster and lymphopenia associated with sodium stibogluconate therapy for cutaneous leishmaniasis. Clin Infect Dis. 1998; 27(3):509-12.

4. CONCLUSÃO

1. A associação do GM-CSF não aumentou a taxa de cura da Miltefosina.

2. A Miltefosina apresentou taxa de cura superior ao antimoniato de meglumina com 66% no grupo tratado com miltefosina isolada e 58% no grupo tratado com a associação ao GM-CSF em comparação ao grupo tratado com antimonial que apresentou taxa de cura de 52%.

3. Não houve diferença no tempo de cicatrização completa das lesões de LC entre os grupos de tratamento.

4. A principal espécie de *Leishmania* encontrada em 91,7% dos casos atendidos foi a *L. guyanensis*. As demais espécies encontradas foram respectivamente *L. brasiliensis* e *L. naiffi* em 4,5% e 3,7% dos casos atendidos.

5. Os eventos adversos com o uso da miltefosina foram leves e bem tolerados. Os principais sintomas foram relacionados com o sistema gastrointestinal, especialmente náuseas, presente em 85,5% dos casos tratados com essa medicação. O uso de ondansetrona antes da administração da medicação aliviou os sintomas e nenhum participante do estudo descontinuou a medicação. Um

participante do grupo SB^{v} apresentou reação adversa grave ao medicamento e necessitou interromper o tratamento.

6. A menor toxicidade, facilidade de administração e taxa de cura superior ao antimoniato de meglumina colocam a miltefosina como uma boa opção terapêutica para o tratamento da LC por *L. guyanensis.*

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA TESE

1. Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MCA, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KBF. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. História, Ciências, Saúde-Manguinhos [Internet]. 2003 Dec;10(3):853–82. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14994709
2. Vale ECS do, Furtado T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. An Bras Dermatol. 2005;80(4):421–8.
3. Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Monophyletic origin of the genus Leishmania Ross, 1903. Ann Parasitol Hum comparée. 1993;68(2):107–8.
4. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, de Souza AA, Braga RR, Ishikawa EA. The dermal leishmaniases of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 1994 Sep;89(3):435–43. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761994000300027&lng=en&tlng=en
5. Oumeish OY. Cutaneous leishmaniasis: A historical perspective. Clin Dermatol. 1999;17(3):249–54.
6. Marzochi MC de A, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniases in Brazil: emerging anthropozoonosis and possibilities for their control. Cad Saude Publica. 1994;10(suppl 2):S359–75.

7. Ortiz RC, Anversa L. Epidemiologia da leishmaniose visceral em Bauru, São Paulo, no período de 2004 a 2012: um estudo descritivo. Epidemiol e Serviços Saúde. 2015;24(1):97–104.
8. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(3):239–51.
9. Brasil M da S. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde. 2017. 191 p.
10. Organization WH. Global Health Observatory [Internet]. 2016 [cited 2016 Sep 2]. Available from: http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html
11. Organization WH. Weekly Epidemiological Record [Internet]. 2016 [cited 2016 Sep 2]. Available from: http://www.who.int/%0A%0Aneglected_diseases/resources/who_wer9122/en/
12. World Health Organization [Internet]. 2016 [cited 2016 Sep 2]. Available from: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Country_profiles/en/
13. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7(5).
14. Saúde OP-A da. Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas. 2020;(9). Available from: https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742%0AOPAS/CDE/VT/20-0041
15. Costa J. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. Gaz Médica da Bahia. 2005;75(Ic):3.
16. Melo MGN de, Morais RCS de, Goes TC de, Silva RPE, Morais RF de, Guerra JA de O, et al. Clinical and epidemiological profiles of patients with American cutaneous leishmaniasis from the states of Pernambuco and Amazonas, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2020;53:e20200083. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822020000100379&tlng=en
17. Guerra JADO, Ribeiro JAS, De Aguiar Raposo Da Camara Coelho LIDARDC, Das Graças Vale Barbosa M, Gomes Paes M. Epidemiology of tegumentary

leishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil. Cad Saude Publica. 2006;22(11):2319–27.

18. Guerra JA de O, Paes MG, Coelho LIAR, Barros MLB, Fé NF, Barbosa M das GV, et al. Estudo de dois anos com animais reservatórios em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana humana em bairro de urbanização antiga na cidade de Manaus-AM, Brasil. Acta Amaz. 2007;37(1):133–7.
19. Augusto J, Guerra DO, Vale G, Paes MG, Sousa RT De, Gama P. Mucosal Leishmaniasis – Clinical and Epidemiological Aspects of 234 Cases Treated in a Tertiary Reference Center in the Brazilian Amazon. J Community Med Health Educ. 2011;01(02):2–5.
20. De Guerra JAO, Maciel MG, De Guerra MVF, Talhari AC, Prestes SR, Fernandes MA, et al. Tegumentary leishmaniasis in the state of amazonas: What have we learned and what do we need? Rev Soc Bras Med Trop. 2015;48(December 2013):12–9.
21. Camara Coelho LI, Paes M, Guerra JA, Barbosa MDG, Coelho C, Lima B, et al. Characterization of Leishmania spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. Parasitol Res. 2011;108(3):671–7.
22. Barbosa MDGV, Fé NF, Marcião AHR, Silva APT, Monteiro WM, Guerra JADO. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de leishmaniose tegumentar americana na área periurbana de Manaus, Estado do Amazonas. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(5):485–91.
23. Oliveira KM de, Wainfas RL, Arnóbio A, Figueiró R. Ecological and social determinants of leishmaniasis in the Legal Amazon, Brazil. Acta Sci Tech. 2013;1(2).
24. Basano S de A, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Rev Bras Epidemiol. 2004;7(3):328–37.
25. Naiff MF, Cupolillo E, Naiff RD, Momen H, Barret T V, Grimaldi GJ. Leishmnaiose tegumentar americana na Amazônia: distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. Rev Soc Bras Med Trop. 1999;31(Supp 1):43.
26. Figueira LDP, Zanotti M, Pinheiro FG, Franco AMR. Caracterização isoenzimática de isolados humanos de Leishmania sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos

municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(5):512–4.

27. Barrett T V., Senra MS. Leishmaniasis in in Manaus, Brazil. Parasitol Today. 1989;5(8):987–9.
28. Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CEP. Immunopathogenic competences of Leishmania (V.) braziliensis and L. (L.) amazonensis in American cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol. 2009;31(8):423–31.
29. Neves LO, Talhari AC, Gadelha EPN, da Silva RM, Guerra JA de O, Ferreira LC de L, et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por Leishmania guyanensis. An Bras Dermatol. 2011;86(6):1092–101.
30. Matta NE, Nogueira RS, Franco AMR, De Souza E Souza I, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, et al. Leishmania (Viannia) guyanensis induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the Brazilian Amazon highland. Am J Trop Med Hyg. 2009;80(3):339–44.
31. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. Brazilian J Med Biol Res. 1998;31(1):143–8.
32. Oghumu S, Lezama-Dávila CM, Isaac-Márquez AP, Satoskar AR. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. Exp Parasitol [Internet]. 2010 Nov;126(3):389–96. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf
33. Coler RN, Reed SG. Second-generation vaccines against leishmaniasis. Trends Parasitol. 2005;21(5):244–9.
34. Dubie T, Mohammed Y. Review on the Role of Host Immune Response in Protection and Immunopathogenesis during Cutaneous Leishmaniasis Infection. J Immunol Res [Internet]. 2020 Jun 18;2020:1–12. Available from: https://www.hindawi.com/journals/jir/2020/2496713/
35. Antonelli LRV, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous

leishmaniasis. Immunol Lett [Internet]. 2005 Nov;101(2):226–30. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247805001410

36. Unger A, O'Neal S, Machado PRL, Guimarães LH, Morgan DJ, Schriefer A, et al. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2009 Apr;80(4):574–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19346378
37. Machado-Pinto J, Pinto J, da Costa CA, Genaro O, Marques MJ, Modabber F, et al. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed Leishmania (Leishmania) amazonensis vaccine plus antimonial. Int J Dermatol [Internet]. 2002 Feb;41(2):73–8. Available from: http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-4362.2002.01336.x
38. Bourreau E, Ronet C, Darcissac E, Lise MC, Sainte Marie D, Clity E, et al. Intralesional Regulatory T-Cell Suppressive Function during Human Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Due to Leishmania guyanensis. Infect Immun [Internet]. 2009 Apr;77(4):1465–74. Available from: https://iai.asm.org/content/77/4/1465
39. Borges AF, Gomes RS, Ribeiro-Dias F. Leishmania (Viannia) guyanensis in tegumentary leishmaniasis. Pathog Dis. 2018;76(4):1–10.
40. Bourreau E, Prévot G, Pradinaud R, Launois P. Unresponsiveness of specific T cells to IL-12 is associated with active cutaneous leishmaniasis owing to Leishmania guyanensis. Scand J Immunol. 2001;54(3):335–9.
41. Kariminia A, Bourreau E, Pascalis H, Couppié P, Sainte-Marie D, Tacchini-Cottier F, et al. Transforming growth factor β1 production by CD4+ CD25 + regulatory T cells in peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects stimulated with Leishmania guyanensis. Infect Immun. 2005;73(9):5908–14.
42. Bourreau E, Ginouves M, Prévot G, Hartley M-A, Gangneux J-P, Robert-Gangneux F, et al. Presence of Leishmania RNA Virus 1 in Leishmania guyanensis Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse. J Infect Dis [Internet]. 2016 Jan 1;213(1):105–11. Available from: https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiv355

43. Guerra JA de O, Talhari S, Paes MG, Garrido M, Talhari JM. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2003 Oct;36(5):587–90. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822003000500008&lng=pt&tlng=pt
44. TALHARI S, ARIAS J, CUNHA M, NAIFF R, NAIFF M, FREITAS RUI, et al. Leishmaniose no estado do Amazonas - Aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. An Bras Dermatol [Internet]. 1988;63. Available from: http://www.anaisdedermatologia.org.br//detalhe-artigo/621
45. Scorza B, Carvalho E, Wilson M. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. Int J Mol Sci [Internet]. 2017 Jun 18;18(6):1296. Available from: http://www.mdpi.com/1422-0067/18/6/1296
46. Gontijo B, Carvalho M de LR de. Leishmaniose tegumentar americana. Med Trop. 2003;36(1):71–80.
47. Fagundes-Silva GA, Sierra Romero GA, Cupolillo E, Gadelha Yamashita EP, Gomes-Silva A, De Oliveira Guerra JA, et al. Leishmania (Viannia) naiffi: Rare enough to be neglected? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(6):797–800.
48. Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Talhari CC, Da Silva RM, Yamashita EPG, De Oliveira Penna G, et al. Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) guyanensis in Manaus, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2011;84(2):255–60.
49. Romero GAS, Ishikawa E, Cupolillo E, Toaldo CB, Guerra MV de F, Paes MG, et al. Identification of antigenically distinct populations of Leishmania (Viannia) guyanensis from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. Acta Trop [Internet]. 2002 Apr;82(1):25–9. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X02000025
50. Guerra M V, Paes MG, Macêdo VO, Romero GAS. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania (Viannia) braziliensis and L. (V.) guyanensis in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. Am J Trop Med Hyg

[Internet]. 2001 Nov 1;65(5):456–65. Available from: http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2001.65.456

51. Furtado T. Critérios para o Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana. An Bras Dermatol. 1980;55(2):81–6.
52. Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G. Genetic Diversity in Natural Populations of New World Leishmania. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93(5):663–8.
53. Benicio E de A, Nunes Gadelha EP, Talhari A, Silva Jr RM da, Ferreira LC, Santos MCC dos, et al. Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of Leishmania guyanensis. An Bras Dermatol. 2011;86(6):1141–4.
54. Van Der Meide W, Guerra J, Schoone G, Farenhorst M, Coelho L, Faber W, et al. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of Leishmania parasites. J Clin Microbiol. 2008;46(1):73–8.
55. Sadeghian G, Nilfroushzadeh MA, Iraji F. Efficacy of local heat therapy by radiofrequency in the treatment of cutaneous leishmaniasis, compared with intralesional injection of meglumine antimoniate. Clin Exp Dermatol. 2007;32(4):371–4.
56. Almeida OLS, Santos JB. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: Uma revisão sistemática da literatura. An Bras Dermatol [Internet]. 2011 Jun;86(3):497–506. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962011000300012&lng=pt&tlng=pt
57. Lima EB de, Porto C, Motta JOC da, Sampaio RNR. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. An Bras Dermatol [Internet]. 2007 Apr;82(2):111–24. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962007000200002&lng=pt&tlng=pt
58. Gadelha EPN, Talhari S, Guerra JA de O, Neves LO, Talhari C, Gontijo B, et al. Efficacy and safety of a single dose pentamidine (7mg/kg) for patients with cutaneous leishmaniasis caused by L. guyanensis: a pilot study. An Bras Dermatol [Internet]. 2015 Dec;90(6):807–13. Available from:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962015000600807&lng=en&tlng=en

59. Neal RA, van Bueren J, McCoy NG, Iwobi M. Reversal of drug resistance in Trypanosoma cruzi and Leishmania donovani by verapamil. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 1989 Mar;83(2):197–8. Available from: https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203(89)90642-1
60. Carter KC, Hutchison S, Henriquez FL, Légaré D, Ouellette M, Roberts CW, et al. Resistance of Leishmania donovani to Sodium Stibogluconate Is Related to the Expression of Host and Parasite γ-Glutamylcysteine Synthetase. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2006 Jan;50(1):88–95. Available from: https://aac.asm.org/content/50/1/88
61. Aflatoonian MR, Sharifi I, Aflatoonian B, Bamorovat M, Heshmatkhah A, Babaei Z, et al. Associated-risk determinants for anthroponotic cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate: A cohort study in Iran. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13(6):1–18.
62. Castro M del M, Cossio A, Velasco C, Osorio L. Risk factors for therapeutic failure to meglumine antimoniate and miltefosine in adults and children with cutaneous leishmaniasis in Colombia: A cohort study. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(4):1–14.
63. Neves LO, Talhari AC, Gadelha EPN, Silva Júnior RM da, Guerra JA de O, Ferreira LC de L, et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por Leishmania guyanensis. An Bras Dermatol [Internet]. 2011 Dec;86(6):1092–101. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962011000600005&lng=pt&tlng=pt
64. Gadelha EPN, Ramasawmy R, da Costa Oliveira B, Morais Rocha N, de Oliveira Guerra JA, Allan Villa Rouco da Silva G, et al. An open label randomized clinical trial comparing the safety and effectiveness of one, two or three weekly pentamidine isethionate doses (seven milligrams per kilogram) in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the Amazon Region. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(10):1–13.

65. Soto J, Soto P. Miltefosine: oral treatment of leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther [Internet]. 2006 Apr 10;4(2):177–85. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14787210.4.2.177
66. Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PM. Miltefosine affects lipid metabolism in Leishmania donovani promastigotes. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(4):1425–30.
67. Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Opperdoes FR. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in Leishmania. Mol Biochem Parasitol. 2000;111(1):1–14.
68. Arthur G, Bittman R. Glycosylated Antitumor Ether Lipids: Activity and Mechanism of Action. Anticancer Agents Med Chem. 2014;14(4).
69. Sundar S, Gupta LB, Makharia MK, Singh MK, Voss A, Rosenkaimer F, et al. Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. Ann Trop Med Parasitol [Internet]. 1999 Sep 15;93(6):589–97. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00034983.1999.11813462
70. Sundar S, Rai M. Treatment of visceral leishmaniasis. Expert Opin Pharmacother [Internet]. 2005 Dec 30;6(16):2821–9. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14656566.6.16.2821
71. Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, et al. Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania braziliensis in Brazil: A Randomized and Controlled Trial. Buffet P, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2010 Dec 21;4(12):e912. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0000912
72. Sundar S. Treatment of visceral leishmaniasis. Med Microbiol Immunol [Internet]. 2001 Nov;190(1–2):89–92. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s004300100088
73. Almeida R, D'Oliveira A, Machado P, Bacellar O, Ko AI, De Jesus AR, et al. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous leishmaniasis. J Infect Dis. 1999;180(5):1735–7.
74. Santos JB, De Jesus AR, Machado PR, Magalhães A, Salgado K, Carvalho EM, 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. 2004;190(10):1793–6.

75. Almeida RP, Brito J, Machado PL, De Jesus AR, Schriefer A, Guimarães LH, et al. Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. Am J Trop Med Hyg. 2005;73(1):79–81.

76. Shi Y, Liu CH, Roberts AI, Das J, Xu G, Ren G, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. Cell Res [Internet]. 2006 Feb 13;16(2):126–33. Available from: http://www.nature.com/articles/7310017

77. Lehmann MH. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor triggers interleukin-10 expression in the monocytic cell line U937. Mol Immunol. 1998;35(8):479–85.

78. Peixoto F, Nascimento MT, Costa R, Silva J, Renard G, Guimarães LH, et al. Evaluation of the Ability of Miltefosine Associated with Topical GM-CSF in Modulating the Immune Response of Patients with Cutaneous Leishmaniasis. J Immunol Res. 2020;2020.

5. ANEXOS

ANEXO 1.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO
Centro de Entomologia Médica
Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000
Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP
(POP_ENTOMOLOGIA_CULTURA_001_v01)

TÍTULO: Procedimento de cultura parasitológica para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar em meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN)

Elaborado por:
Denison Vital de Jesus
Yolanda Freitas Noguth

Revisado e aprovado por:
Luciana Mendes dos Santos

Data de aplicação

Data da próxima revisão

OBJETIVO

Descrever o diagnóstico parasitológico da leishmaniose tegumentar pelo cultivo de *Leishmania* spp. a partir de amostras de tecido humano em meio *MacNeal, Nove e Nicolle* (NNN).

DEFINIÇÕES

Cultura Parasitológica: método parasitológico indireto que permite a multiplicação dos parasitos em meios artificiais aumentando a sensibilidade do diagnóstico.
Meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN): Ágar sangue modificado de escolha para o isolamento e manutenção de tripanossomatídeos patogênicos.

CAMPO DE APLICAÇÃO

O procedimento se aplica à pesquisa e diagnóstico laboratorial de rotina.

RESPONSABILIDADES
Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

POP´S RELACIONADOS

EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO NECESSÁRIOS

Avental manga longa descartável
Luva de látex descartável
Mascara descartável
Propé descartável
Touca descartável
Óculos de proteção

RECUROS NECESSÁRIOS

Materiais
Lâminas para microscopia (26.0 x 76.0 mm)
Lamínulas para microscopia (20 x 20 mm ou 18 x 18 mm)
Compressa de gaze estéril (7,5 x 7,5 cm)
Seringa descartável (3 mL e 5 mL)
Tubos de ensaio com tampa (10 mL)
Placa de petri (49 x 23 mm)
Estante para tubos de ensaio
Frasco lavador com álcool 70%
Lâmina de bisturi
caixa de descarte de material perfurocortante
Caixa de descarte de material com solução desinfetante

Equipamentos
Câmara de fluxo laminar de risco biológico
Estufa incubadora B.O.D (*biochemical oxygen demand*)
Estufa de esterilização e secagem
Microscópio óptico comum
Microscópio óptico invertido

Reagentes, meios e soluções
Meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN)
Sulfato de Gentamicina (80 mg)
Soro fisiológico 0,9%
Álcool 70%

PROCEDIMENTOS
Preparo da amostra de tecido
Este procedimento deve ser realizado em uma câmara de fluxo laminar de risco biológico, para evitar contaminação.
Colocar o fragmento de pele em uma placa de petri contendo soro fisiológico com sulfato de gentamicina 80 mg.
Com ajuda de uma lâmina de bisturi e seringa realizar a limpeza do fragmento, de modo que as sujidades presentes na superfície da pele sejam removidas.
Com uma lâmina de bisturi dividir o fragmento ao meio, para que a semeadura seja feita em duplicata.

Processo de semeadura
Este procedimento deve ser realizado em uma câmara de fluxo laminar de risco biológico, para evitar contaminação.
Adicionar 300 µL de soro fisiológico autoclavado com gentamicina a 1% em dois tubos contendo meio NNN.
Inocular os fragmentos de pele nos tubos de ensaio (um em cada tubo).
Homogeneizar os tubos e transferir para uma estufa B.O.D. regulada a 28ºC.
Período e forma de leitura
Realizar leitura em microscópio óptico invertido em intervalos de 7 a 28 dias após o cultivo.
LIMITAÇÕES
A cultura parasitológica quando feita de forma inadequada apresenta importantes índices de contaminação por fungos e bactérias, dificultando o processo de leitura e manutenção das cepas.
REFERÊNCIAS
ANEXOS
Não se aplica.

ANEXO 2.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO
Centro de Entomologia Médica
Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000
Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP
(POP_ENTOMOLOGIA_EXAM_DIRETO_001_v01)

TÍTULO: Exame parasitológico direto pelo método de escarificação para diagnóstico laboratorial de Leishmaniose Tegumentar.

Elaborado por:	**Revisado e aprovado por:**	**Data de aplicação**
Denison Vital de Jesus	**Luciana Mendes dos Santos**	
Maria Auxiliadora Chiarion		
		Data da próxima revisão

OBJETIVO
Descrever o diagnóstico parasitológico direto da leishmaniose tegumentar pelo método de escarificação.

DEFINIÇÕES
Método de escarificação: baseia-se na evidenciação do parasita através da raspagem da lesão ulcerada. É procedimento de primeira escolha por ser mais rápido, de menor custo e de fácil execução.

CAMPO DE APLICAÇÃO
O procedimento se aplica à pesquisa e diagnóstico laboratorial de rotina.

RESPONSABILIDADES
Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

POP´S RELACIONADOS
EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO NECESSÁRIOS
6.1 Luva de látex descartável
6.3 Máscara descartável
6.4 Avental manga longa descartável

RECUROS NECESSÁRIOS
Materiais
Algodão embebido em álcool a 70%
Lanceta estéril descartável (Aço inoxidável 5,5 cm)

Compressa de gaze estéril (7,5 x 7,5 cm)
Lâminas para microscopia (26,0 x 76,0 mm)
Esparadrapo impermeável (10,0 x 4,5 cm)
Papel toalha
Caixa de descarte de material perfurocortante

Equipamentos
Microscópio óptico comum

Reagentes e soluções
Soro fisiológico 0,9%
Álcool 70%
Kit Panótico Rápido
Óleo de imersão para microscopia
Sulfato de Neomicina 5 mg

PROCEDIMENTOS
Procedimento de escarificação
Realizar a limpeza da lesão com solução fisiológica utilizando gaze estéril, caso o paciente tenha mais de uma lesão, selecionar duas lesões mais recentes;
Com auxílio de lanceta estéril escarificar pelo menos três diferentes áreas da borda da lesão, de preferência área eritematosa da superfície íntegra que a circunda;
Transferir o material escarificado para uma lâmina de microscopia previamente identificada, realizando pelo menos dois esfregaços circulares;
Após o procedimento aplicar Sulfato de Neomicina nas lesões escarificadas e cobrir com gaze estéril e prender com esparadrapo.

Procedimento de coloração
Para a realização da coloração utiliza-se kit Panótico rápido.
Submergir as lâminas em solução 1 (Álcool) e deixar permanecer por minuto. Esta etapa garante a fixação do material na lâmina;
Submergir as lâminas na solução 2 (Eosina) e deixar permanecer por um minuto, deixar escorrer bem;
Submergir as lâminas na solução 3 (Azul de metileno) e deixar permanecer por dois minuto;
Lavar as lâminas com água corrente (jato fraco);
Deixar secar em temperatura ambiente, analisar no microscópio.

Microscopia
Na observação microscópica deve-se procurar formas amastigotas isoladas ou intracelulares, que podem apresentar-se de forma circular ou ovoide.
A leitura das lâminas devem ser realizadas em microscópio ótico comum utilizando a objetiva de maior aumento (100x) com o auxílio do óleo de imersão;
Para um resultado fidedigno, analisar toda a lâmina.

Resultados

Resultado Positivo: presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp.
Resultado negativo: ausência de formas amastigotas de *Leishmania* sp.

LIMITAÇÕES
O uso de antibióticos e/ou remédios caseiros aplicados na lesão podem contribuir para um resultado falso negativo;
A coleta do material com muito sangue dilui o material causando a diminuição da quantidade de *Leishmanias*;
Lesões associada a infecções secundárias podem se tornar inviáveis para a realização do exame pelo auto grau de inflamação.
REFERÊNCIAS
ANEXOS
Não se aplica

ANEXO 3.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO
Centro de Entomologia Médica
Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000
Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP
(Novo código)
TÍTULO: Procedimento de manutenção e repicagem

Elaborado por:	**Revisado e aprovado por:**	**Data de aplicação**
Denison Vital de Jesus Yolanda Freitas Noguth	**Luciana Mendes dos Santos**	**Data da próxima revisão**

OBJETIVO
Descrever o procedimento de manutenção e repicagem de cepas de Leishmania spp.

DEFINIÇÕES
Repicagem: transferência de microorganismos de um meio de cultura para o outro.

CAMPO DE APLICAÇÃO
O procedimento se aplica à pesquisa.

RESPONSABILIDADES
Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.
POP´S RELACIONADOS

EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO NECESSÁRIOS
Avental manga longa descartável
Luva de látex descartável
Mascara descartável
Propé descartável
Touca descartável
Óculos de proteção

RECUROS NECESSÁRIOS
Materiais
Compressa de gaze estéril (7,5 x 7,5 cm)
Seringa descartável (3 mL)
Frasco lavador com álcool 70%
Caixa de descarte de material perfurocortante

Equipamentos
Câmara de fluxo laminar de risco biológico
Estufa incubadora B.O.D (biochemical oxygen demand)
Microscópio óptico invertido

Reagentes, meios e soluções
Meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN)
Soro fisiológico 0,9%
Sulfato Gentamicina (80 mg)
Álcool 70%

PROCEDIMENTOS
Para observação das culturas é necessário trabalhar em local estéril, desde modo evitando a contaminação do material por fungos e bactérias.
Procedimento de repicagem
Adicionar ao tubo de ensaio com NNN 3 µL de soro fisiológico autoclavado + 1% de Sulfato de gentamicina.
Transferir uma alíquota da cultura anterior para o novo tubo devidamente identificado.
Incubar os tubos na estufa B.O.D. a 28°C.
Guardar a cultura antiga (pé atrás) por pelo menos 7 dias.
Após esse período, realizar novamente este procedimento.

LIMITAÇÕES
A falta de cuidados no manuseio da amostra pode ocasionar contaminação da mesma, resultando em sua inutilização.

REFERÊNCIAS

ANEXOS
Não se aplica.

ANEXO 4

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO
Centro de Entomologia Médica
Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000
Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP
(Novo código)

TÍTULO: Preparo de meio cultura de fase sólida MacNeal, Novy e Nicolle (NNN)

Elaborado por:	**Revisado e aprovado por:**	**Data de aplicação**
Denison Vital de Jesus Yolanda Noguth	**Luciana Mendes dos Santos**	**Data da próxima revisão**

OBJETIVO
Descrever o procedimento de preparo do meio de cultura NNN para o diagnóstico parasitológico da leishmaniose tegumentar pelo cultivo de Leishmania spp.

DEFINIÇÕES
Meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN): Ágar sangue modificado de escolha para o isolamento e manutenção de tripanossomatídeos patogênicos.

CAMPO DE APLICAÇÃO
O procedimento se aplica à pesquisa e diagnóstico laboratorial de rotina.

RESPONSABILIDADES
Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

POP´S RELACIONADOS
EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO NECESSÁRIOS
Avental manga longa descartável
Luva de látex descartável
Mascara descartável
Propé descartável
Touca descartável
Óculos de proteção

RECUROS NECESSÁRIOS
Materiais

Compressa de gaze estéril (7,5 x 7,5 cm)
Seringa descartável (20 mL)
Erlenmeyer (250 mL)
Balão de fundo chato (250 mL)
Pipeta graduada (5 e 10 mL)
Controlador eletrônico de pipetas
Perolas de vidro
Tubos de ensaio com tampa (10 mL)
Estante para tubos de ensaio
Frasco lavador com álcool 70%
Caixa de descarte de material perfurocortante
Caixa de descarte de material com solução desinfetante

Equipamentos
Autoclave vertical
Câmara de fluxo laminar de risco biológico
Estufa incubadora B.O.D (biochemical oxygen demand)
Estufa de esterelização e secagem
Banho maria
Bico de Bunsen
Refrigerador
Balança analítica

Reagentes, meios e soluções
Meio Brain Heart Infusion Ágar (BHI)
Sangue desfibrinado de coelho
Água destilada
Sulfato de gentamicina (80 mg)
Álcool 70%

PROCEDIMENTOS
Preparo das vidrarias
Os tubos de ensaio com tampa e a pipeta graduada devem ser esterilizadas previamente por autoclavação por 15 minutos a 121°C e secas na estufa de esterelização.

Preparo do sangue
Coletar 20 mL de sangue de coelho e transferir para um Erlenmeyer estéril contendo as pérolas de vidro e agitar até a completa desfibrinação do sangue.
Adicionar 200 µL de Sulfato de gentamicina.
Agitar por 30 minutos.

Preparo do meio
Pesar 6,24g de BHI e colocar em um balão de fundo chato.
Adicionar 120 mL de água destilada.
Autoclavar por 15 minutos a 121°C.
Resfriar em banho maria a 45°C.

Adicionar 20 mL de sangue desfibrinado de Coelho.
Manter o meio a 45°C em banho maria controlado.
Transferir 2,5 mL do meio para os tubos de ensaio com tampa com auxílio da pipeta graduada e controlador eletrônico de pipetas.
Manter os tubos inclinados a 45 graus para aguardar a solidificação do meio.
Deixar em temperatura ambiente para o teste de esterelidade por dois dias.
Armazenar na geladeira a 4°C por até 30 dias.

LIMITAÇÕES

A hemocultura requer condições assépticas para a colheita e manuseio da amostra de sangue, o que a torna pouco prática para os trabalhos de campo. Embora apresente alta especificidade, a sensibilidade da hemocultura, baseada em apenas um exame, varia de 40% a 50%, sendo mais baixa na fase crônica da doença de Chagas (2).

REFERÊNCIAS

1. Araújo-Jorge TC, Pirmez C. Normas de segurança para o trabalho com Trypanosoma cruzi. In: Araújo-Jorge TC, Castro SL. Doença de Chagas: manual para experimentação animal. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ 2000, p. 125-132.
2. Bronfen E, de Assis Rocha FS, Machado GB, Perillo MM, Romanha AJ, Chiari E. Isolation of Trypanosoma cruzi samples by xenodiagnosis and hemoculture from patients with chronic Chagas‟ disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989; 84(2): 237-40.
3. Miles MA, Póvoa MM, Souza AA, Lainson R, Shaw JJ, Ketteridge DS. Chagas‟ disease in the Amazon Basin. II. Distribution of Trypanosoma cruzi zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1981; 75, 667-74.

11. ANEXOS

Não se aplica.

ANEXO 5

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO
Centro de Entomologia Médica
Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000
Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP
(POP_Consultas_001_v01)

TÍTULO: Retornos para consultas programadas.

Elaborado por:	**Revisado e aprovado por:**	**Data de aplicação**
Bleno Leonam Goncalves da Costa.	**Luciana Mendes dos Santos**	**Data da próxima revisão**

OBJETIVO

Descrever o procedimento de consultas programadas.

DEFINIÇÕES
As consultas programadas aconteceram a cada 30 dias após a inclusão do participante no período de 6 meses, sendo denominadas D30, D60, D90 e D180, havendo possibilidade do participante retornar em consulta extra caso há qualquer momento.

CAMPO DE APLICAÇÃO
O procedimento se aplica à pesquisa e consultas de rotina.

RESPONSABILIDADES
Investigador e enfermeiro.

POP´S RELACIONADOS
EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO NECESSÁRIOS
Luva de látex descartável;
Mascara descartável.

RECUROS NECESSÁRIOS
Materiais
Caneta;
Adesivo para identificação da lesão.
Régua milimetrada
Esfigmomanômetros digitais
Termômetro
Equipamentos
Câmera fotográfica.

PROCEDIMENTOS
Procedimento na consulta
Realizar agendamento prévio pelo enfermeiro;
Registrar dados de identificação do participante no prontuário do participante na FMT-HVD e no prontuário físico destinado a pesquisa;
Registrar sinais vitais e peso, sinais e sintomas relacionados à leishmaniose ou tratamento proposto;
Avaliar clinicamente a lesão, efetuar a palpação de linfonodos e registrar características e tamanho;
Durante consulta D30 solicitar exames para avaliação de eventos adversos pós tratamento;
Na Consulta D90 avaliar e registrar cura ou falha no prontuário. Caso seja falha por a lesão ainda está ativa, propor um novo tratamento para o participante;

LIMITAÇÕES
Os participantes acometidos pela patologia em questão são residentes na maioria das vezes de área rural do estado do Amazonas, dificultado para o retorno nas consultas e acompanhamento. No caso de participantes que não compareciam à consulta, era

tentato contato telefônico para remarcação de consulta o mais breve possível e se não possível o retorno ou falha de contato telefônico, era realizada a busca ativa e consulta em domicílio.

REFERÊNCIAS

ANEXOS

Ficha clílica (CRF) D0, D30, D60, D90 e D180

Nº Prontuário: _____

ESTUDO DE EFICÁCIA E EFETIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO MILTEFOSINA E GM-GSF NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEO CAUSADA POR *leishmania (Viannia) braziliensis e Leishmania guyanensis* NA REGIÃO DE MANAUS-AM

Visita (D0)

ID participante: _____

Data da coleta: _____

Data de Nascimento: _____ Idade: _____

Cor: _____

Exame Médico (EM)	
Glicemia:	
Tensão Arterial:	
Pulso:	
Peso:	|___|___|___|.|___| kg
Temperatura:	|___|___|.|___| °C
Comorbidades:	Diabetes: ☐ Não ☐ sim
	Hipertensão: ☐ Não ☐ sim
Sintomas Associados:	**Escala**
Cefaleia: ☐ Não ☐ Sim*	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10

Febre: ☐ Não ☐ Sim* Dor (no local): ☐ Não ☐ Sim* Artralgia: ☐ Não ☐ Sim* Mialgia: ☐ Não ☐ Sim* Outro(s): _____ _____ ___	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10 ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10 ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10 ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10 ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Necessitou atendimento de urgência:	☐ Não ☐ sim
Necessitou terapia medicamentosa:	☐ Não ☐ sim
Número total de lesões de pele:	
Tempo de duração da lesão ativa:	
Característica da lesão: ☐ Ulcerada ☐ Exulceração ☐ Pápula ☐ Pápula com Exulceração ☐ Nódulo ☐ Nódulo com Exulceração	
Lesão principal	
Local da maior lesão: ☐ Cabeça ☐ Tronco ☐ Braço (D) ☐ Braço (E) ☐ Antebraço (D) ☐ Antebraço (E) ☐ Coxa (D) ☐ Coxa (E) ☐ Perna (D) ☐ Outro: _____ ☐ Perna (E) _____	
Tamanho da maior lesão (mm):	Infil _____x_____ Ulceração _____x_____
Infecção Secundária:	☐ Não ☐ sim
Possui outras lesões:	☐ Não ☐ sim * Se SIM, especificar o local e o tamanho: _____
Lifadenopatia	
Lifadenopatia presente:	☐ Não ☐ sim

Cadeia(s) Envolvida (s):	☐ Cervical ☐ Occipital ☐ Axilar		☐ Inguinal ☐ Crural ☐ Outra	
Tamanho do maior linfonodo (mm):	_____x_____			
LEUCOGRAMA	Hb/HT	TGO/TGP	U/Cr	AMILASE
Rubrica e data da pessoa responsável				

Leishmaniose Nº Prontuário:

_____

ESTUDO DE EFICÁCIA E EFETIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO MILTEFOSINA E GM-GSF NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEO CAUSADA POR *leishmania (Viannia) braziliensis e Leishmania guyanensis* NA REGIÃO DE MANAUS-AM

Visita (D30)

ID Participante:

_____

Data da coleta:

_____

Exame Médico (EM)	
Glicemia:	
Tensão Arterial:	
Pulso:	
Peso:	|___|___|___|.|___| kg
Temperatura:	|___|___|.|___| °C
Efeitos colaterais desde a última visita:	☐ Não ☐ sim
Sintomas Associados:	**Escala**
Cefaleia: ☐ Não ☐ Sim*	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10

Náuseas ☐ Não ☐ Sim*	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Vômitos ☐ Não ☐ Sim*	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Febre: ☐ Não ☐ Sim*	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Dor (no local): ☐ Não ☐ Sim*	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Artralgia: ☐ Não ☐ Sim*	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Mialgia: ☐ Não ☐ Sim*	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Outro(s): _____ _____ _____	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Vinha em uso regular de medicamento?	☐ Não ☐ sim
Vem em uso de outra droga (nome da dosagem): _____	
Característica da lesão:	☐ Ulcerada Ativa ☐ Cicatrização Parcial ☐ Cicatrização Total **(Se sim, tempo de cicatrização): _____**

Exame da Pele

Local da maior lesão:

☐ Cabeça	☐ Tronco	☐ Braço (D)
☐ Braço (E)	☐ Antebraço (D)	☐ Antebraço (E)
☐ Coxa (D)	☐ Coxa (E)	☐ Perna (D)
☐ Perna (E)	☐ Face	☐ Pescoço
☐ Outro: _____		

Tamanho da maior lesão (mm):	_____x_____
Tipo da lesão: ☐ Ulcerada ☐ Exulceração ☐ Pápula ☐ NA ☐ Pápula com Exulceração ☐ Nódulo ☐ Nódulo com Exulceração	
Infecção Secundária:	☐ Não ☐ sim
Novas lesões:	☐ Não ☐ sim *

	Se SIM, especificar quantidade, local e tipo de nova lesão: _____ _____
Lifadenopatia	
Lifadenopatia presente:	☐ Não ☐ sim
Cadeia(s) Envolvida (s):	☐ Cervical ☐ Occipital ☐ Axilar ☐ Inguinal ☐ Crural ☐ Outra
Tamanho do maior linfonodo (mm):	_____x_____

LEUCOGRAMA	Hb/HT	TGO/TGP	U/Cr	AMILASE

Rubrica e data da pessoa responsável

Nº Prontuário: _____

ESTUDO DE EFICÁCIA E EFETIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO MILTEFOSINA E GM-GSF NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEO CAUSADA POR *leishmania (Viannia) braziliensis e Leishmania guyanensis* NA REGIÃO DE MANAUS-AM

Visita (D60)

ID Participante:
_____

Data da coleta:
_____

Exame Médico (EM)

Glicemia:	
Tensão Arterial:	
Pulso:	
Peso:	|___|___|___|.|___| kg
Temperatura:	|___|___|.|___| °C
Efeitos colaterais desde a última visita:	☐ Não ☐ sim
Sintomas Associados:	**Escala**
Cefaleia: ☐ Não ☐ Sim*	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Náuseas ☐ Não ☐ Sim*	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Vômitos ☐ Não ☐ Sim*	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Febre: ☐ Não ☐ Sim*	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Dor (no local): ☐ Não ☐ Sim*	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Artralgia: ☐ Não ☐ Sim*	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Mialgia: ☐ Não ☐ Sim*	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Outro(s): _____ _____ _____	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Data do término do Tratamento: _____	
Característica da lesão:	☐ Ulcerada Ativa ☐ Cicatrização Parcial ☐ Cicatrização Total **(Se sim, tempo de cicatrização): _____**
Exame da Pele	
Local da maior lesão: ☐ Cabeça ☐ Tronco ☐ Braço (D) ☐ Braço (E) ☐ Antebraço (D) ☐ Antebraço (E) ☐ Coxa (D) ☐ Coxa (E) ☐ Perna (D) ☐ Perna (E) ☐ Face ☐ Pescoço ☐ Outro: _____	

Tamanho da maior lesão (mm):	_____x_____
Tipo da lesão: ☐ Ulcerada ☐ Exulceração ☐ Pápula ☐ NA ☐ Pápula com Exulceração ☐ Nódulo ☐ Nódulo com Exulceração	
Infecção Secundária:	☐ Não ☐ sim
Novas lesões:	☐ Não ☐ sim * Se SIM, especificar quantidade, local e tipo de nova lesão: _____ _____
Lifadenopatia	
Lifadenopatia presente:	☐ Não ☐ sim
Cadeia(s) Envolvida (s): ☐ Cervical ☐ Occipital ☐ Axilar ☐ Inguinal ☐ Crural ☐ Outra	
Tamanho do maior linfonodo (mm):	_____x_____

LEUCOGRAMA	Hb/HT	TGO/TGP	U/Cr	AMILASE

Rubrica e data da pessoa responsável

Nº Prontuário: _____

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD

ESTUDO DE EFICÁCIA E EFETIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO MILTEFOSINA E GM-GSF NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEO CAUSADA POR *leishmania (Viannia) braziliensis e Leishmania guyanensis* NA REGIÃO DE MANAUS-AM

Visita (D90)

ID Participante:
_____

Data da coleta:
_____

Exame Médico (EM)	
Glicemia:	
Tensão Arterial:	
Pulso:	
Peso:	|___|___|___|.|___| kg
Temperatura:	|___|___|.|___| °C
Avaliação do Tratamento	
Característica da lesão:	☐ Ulcerada Ativa ☐ Cicatrização Parcial ☐ Cicatrização Total **(Se sim, tempo de cicatrização):** _____
Local da maior lesão: ☐ Cabeça ☐ Tronco ☐ Braço (D) ☐ Braço (E) ☐ Antebraço (D) ☐ Antebraço (E) ☐ Coxa (D) ☐ Coxa (E) ☐ Perna (D) ☐ Perna (E) ☐ Face ☐ Pescoço ☐ Outro: _____	
Tamanho da maior lesão (mm):	_____x_____
Tipo da lesão: ☐ Ulcerada ☐ Pápula com Exulceração ☐ Exulceração ☐ Nódulo ☐ Pápula ☐ Nódulo com Exulceração ☐ NA	
Infecção Secundária:	☐ Não ☐ sim
Novas lesões:	☐ Não ☐ sim * Se SIM, especificar quantidade, local e tipo de nova lesão: _____
Desfecho do Tratamento	

Conclusão Atual do Tratamento	☐ Cura ☐ Falha ☐ Abandono			
Indicado novo tratamento para leishmaniose:	☐ Não ☐ sim * Se “sim”, especifique medicação: _____			
LEUCOGRAMA	Hb/HT	TGO/TGP	U/Cr	AMILASE
Rubrica e data da pessoa responsável				

Leishmaniose Nº Prontuário: _____

ESTUDO DE EFICÁCIA E EFETIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO MILTEFOSINA E GM-GSF NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEO CAUSADA POR *leishmania (Viannia) braziliensis e Leishmania guyanensis* NA REGIÃO DE MANAUS-AM

Visita (D180)

ID Participante: _____
Data da coleta: _____

Exame Médico (EM)	
Glicemia:	
Tensão Arterial:	
Pulso:	
Peso:	|___|___|___|.|___| kg
Temperatura:	|___|___|.|___| °C
Avaliação do Tratamento	
Característica da lesão:	☐ Ulcerada Ativa ☐ Cicatrização Parcial ☐ Cicatrização Total **(Se sim, tempo de cicatrização):** _____

Local da maior lesão:			
☐ Cabeça	☐ Tronco	☐ Braço (D)	
☐ Braço (E)	☐ Antebraço (D)	☐ Antebraço (E)	
☐ Coxa (D)	☐ Coxa (E)	☐ Perna (D)	
☐ Perna (E)	☐ Face	☐ Pescoço	
☐ Outro: _____			
Tamanho da maior lesão (mm):	_____x_____		
Tipo da lesão:	☐ Ulcerada	☐ Pápula com Exulceração	
	☐ Exulceração	☐ Nódulo	
	☐ Pápula	☐ Nódulo com Exulceração	
	☐ NA		
Infecção Secundária:	☐ Não ☐ sim		
Novas lesões:	☐ Não ☐ sim * Se SIM, especificar quantidade, local e tipo de nova lesão: _____ _____		
Desfecho do Tratamento			
Conclusão Atual do Tratamento	☐ Cura ☐ Falha ☐ Abandono		
Indicado novo tratamento para leishmaniose:	☐ Não ☐ sim * Se “sim”, especifique medicação: _____ _____		
LEUCOGRAMA	Hb/HT	TGO/TGP	U/Cr	AMILASE
Rubrica e data da pessoa responsável				

ANEXO 6

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO
Centro de Entomologia Médica
Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000

Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP
(POP_ENTOMOLOGIA_BIOPSIA_001_v01)

TÍTULO: Extração Biopsia.

Elaborado por:	**Revisado e aprovado por:**	**Data de aplicação**
Bleno Leonam Gonçalves da Costa	**Luciana Mendes dos Santos**	
		Data da próxima revisão

OBJETIVO
Descrever o Procedimento realizado para biopsia.

DEFINIÇÕES
A biopsia é um procedimento cirúrgico no qual se colhe uma amostra de tecidos para posterior estudo em laboratório e usada para diagnosticar doenças.

CAMPO DE APLICAÇÃO
O procedimento se aplica à pesquisa e diagnóstico laboratorial na realização da analise em cultura e PCR.

RESPONSABILIDADES
Médico investigador e enfermeiro.

POP´S RELACIONADOS
EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO NECESSÁRIOS
Luva de látex descartável;
Luva estéril;
Mascara descartável;
Avental manga longa descartável;

RECUROS NECESSÁRIOS
Materiais
1 punch número 4mm
1 pipeta com álcool;
1 pipeta com soro fisiológico;
Compressa de gaze estéril (7,5 x 7,5 cm);
Esparadrapo impermeável (10,0 x 4,5 cm);
Pinça kelly;

Caixa de descarte de material perfuro-cortante;
Lâmina de bisturi;
Fio de sutura;
Tesoura cirúrgica.

Equipamentos
Maca.

Reagentes e soluções
Soro fisiológico 0,9%.
Álcool 70%;
Clorexidina degermante;
Sulfato de Neomicina 5 mg.

PROCEDIMENTOS
Procedimento de biopsia.
Realizar a limpeza da lesão com solução fisiológica e clorexidina degermante utilizando gaze estéril, caso o paciente tenha mais de uma lesão, selecionar duas lesões mais recentes;
Com auxílio do punch extrair da borda da úlcera, de preferência área eritematosa da superfície íntegra que a circunda, um fragmento de pele;
1 ´poonto de sutura do defeito cirúrgico com fio naylon para apromixar as bordas
Após o procedimento limpar a lesão com clorexidina degermante e comprimir até realizar homeostase e cobrir com gaze estéril e prender com esparadrapo.
Cortar o fragmento de pele coletado em duas partes iguais com a lâmina de bisturi e transferir o material para as duas pipetas;

Transporte para armazenamento
O material deve ser levado para a entomologia e a pipeta com álcool deve ser colocada no freezer, a outra pipeta com soro fisiológico deve ser colocada na geladeira.

LIMITAÇÕES
Verificar a disponibilidade do centro cirúrgico.

REFERÊNCIAS

ANEXOS
Não se aplica

ANEXO 7

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO
Centro de Entomologia Médica
Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000
Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP
(POP_ENTOMOLOGIA_TCLE_001_v01)

TÍTULO: Plano de gerenciamento da obtenção do TCLE.

Elaborado por:	**Revisado e aprovado por:**	**Data de aplicação**
Bleno Leonam Goncalves da Costa	**Luciana Mendes dos Santos**	
		Data da próxima revisão

OBJETIVO

Descrever atividades de gerenciamento da obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE dos participantes do Estudo de Eficácia e Efetividade da Associação Miltefosina e GM-CSF no Tratamento da Leishmaniose Cutânea Causada por Leishmania (Viannia) braziliensis Leishmania (Viannia) guyanensis na Região de Manaus - AM na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD, em Manaus/AM – Brasil.

DEFINIÇÕES

Gerenciar os procedimentos operacionais referentes a aplicação e obtenção do TCLE na inclusão de participantes no ensaio clínico para avaliar a Efetividade da Associação Miltefosina e GM-CSF no Tratamento da Leishmaniose Cutânea Causada por Leishmania (Viannia) braziliensis Leishmania (Viannia) guyanensis, confirmado por exame parasitológico direto para leishmaniose pelo método de escarificação.

CAMPO DE APLICAÇÃO

Potenciais participantes de 18 a 65 anos que procurem a FMT-HVD para tratamento Leishmaniose Cutânea , confirmado por exame parasitológico direto para leishmaniose pelo método de escarificação, podendo ser residente na área urbana da cidade Manaus ou área rural.

RESPONSABILIDADES

Este plano aplica-se ao Investigador Principal, Coordenador do estudo e equipe multidisciplinar do centro, principalmente aos profissionais médicos e enfermeiros para aplicação do TCLE no recrutamento e retenção de participantes. O coordenador do estudo será responsável por manter a equipe atualizada no plano de obtenção do TCLE, quando necessário.

POP´S RELACIONADOS
POP_ENTOMOLOGIA_EXAM_DIRETO_001_v01
EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO NECESSÁRIOS
Luva de látex descartável;
Óculos de proteção.

RECUROS NECESSÁRIOS
Materiais
TCLE impresso;
Caneta;
Câmera Fotográfica;
Adesivo para identificação da lesão.
Esfigmomanômetro digital
Termômetro
Régua milimetrada
Equipamentos
Microscópio óptico comum.
Reagentes e soluções
Soro fisiológico 0,9%
Álcool 70%

PROCEDIMENTOS
Aplicação do TCLE é a primeira conduta frente ao potencial participante que ao ser abordado por membro da equipe do centro manifestar intenção de participar do estudo clínico, podendo ser aplicado somente na FMT-HVD. Nenhum procedimento deve ser realizado antes da aplicação e obtenção de assinatura nos referidos termos.
Durante a apresentação e aplicação do TCLE/ TALE para o participante, estão padronizados os seguintes procedimentos:
Explicar para o participante todas as informações do TCLE/ TALE, sempre com linguagem mais adequada possível evitando termos técnicos que dificultem a compreensão do sujeito da pesquisa;
Explicar de forma clara o que se trata o TCLE;
Explicar detalhadamente todos os riscos e benefícios em participar do estudo;
Explicar detalhadamente todos os riscos e benefícios em participar do estudo;
Perguntar ao participante se existe dúvidas sobre o estudo clínico e responder as mesmas até que todas as dúvidas sejam respondidas e entendidas. Não deve ser assinado o TCLE enquanto houver qualquer questionamento pelo participante sem que seja feito o esclarecimento quantas vezes se façam necessário;
Após a concordância do participante em relação ao TCLE, o mesmo é assinado pelo participante e pelo membro da equipe do estudo que aplicou o TCLE, na FMT-HVD haverá sempre um Médico(a) do estudo disponível para esclarecer qualquer dúvida médica que o participante tenha;
Nos casos de participantes analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual, uma testemunha imparcial deve se fazer presente durante toda a discussão do consentimento informado e após a obtenção do consentimento verbal do participante, a testemunha deverá assinar o TCLE;

A assinatura deverá ser na presença do profissional que aplica o termo de consentimento e deverá ser datada. Tanto o profissional quanto o participante deverão assinar o TCLE em duas vias, ficando uma via no prontuário clinico e outra entregue ao participante.
O TCLE deverá ser revisado se está devidamente assinado e datado pelo participante e pelo responsável da aplicação. Depois será guardada uma via juntamente com o prontuário clínico do sujeito da pesquisa e outra via em posse do participante;
Todo o processo de consentimento deverá ser documentado em prontuário médico pelo profissional que aplicou o TCLE, com o intuito de registrar detalhadamente como o processo foi realizado para aquele participante.
Controle dos Registro
O controle da aplicação do TCLE, bem como a sua assinatura, será feito pelo Enfermeiro do Estudo após cada nova inclusão e nas monitorias da CRO.

REFERÊNCIAS

ANEXOS

TCLE
INVESTIGADOR PRINCIPAL:
ASSINATURA: _____ DATA_____

Anexo – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Projeto: ESTUDO DE EFICÁCIA E EFETIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO

Nome do Projeto: ESTUDO DE EFICÁCIA E EFETIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO MILTEFOSINA E GM-CSF NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *LEISHMANIA (VIANNIA) GUYANENSIS* NA REGIÃO DE MANAUS - AM

Investigador em Manaus: Jorge Augusto de Oliveira Guerra, Médico.
 Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado - Gerência de leishmaniose
Av. Pedro Teixeira, 25 D. Pedro Manaus-AM 69040000
(92)2127 3555, (92) 99988 3215, 2127 3518.

Comitê de Ética: Comitê de Ética em Pesquisas da FMTHVD
Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado
Horário de funcionamento: Segunda a sexta e 8:00 ás 13:00h
Av. Pedro Teixeira, 25 D. Pedro Manaus-AM 69040000
Fone: 2127 3555

Nome do Paciente:

1. Para ser lido por todos os participantes do estudo:
As informações a seguir descreverão o estudo e a forma como você vai participar. O investigador responderá quaisquer perguntas que você possa fazer sobre o estudo. Por favor, escute cuidadosamente e não hesite em perguntar qualquer coisa sobre as informações prestadas. Esse documento tem duas vias, e uma delas ficará com você.

2. Convite e Propósito do Estudo:
Nós estamos convidando você para participar de um estudo sobre a leishmaniose cutânea, que nós estamos fazendo na Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMTHVD). Esta doença é causada pela picada de um mosquito infectado e causa lesões na pele - Leche ou Ferida braba. Nós estamos pedindo para você participar deste estudo porque você apresenta essa doença e já foi mostrado em outros estudos que existem dois medicamentos que podem ajudar no seu tratamento: um medicamento chamado Miltefosina, e uma substancia chamada de fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos que chamamos de GM-CSF.
Assim sendo, o objetivo deste estudo é comparar a cura da leishmaniose cutânea com Miltefosina associada ao GM-CSF, a Miltefosina associada a placebo (que é uma substancia que não produz nenhum efeito em seu organismo) e também a Miltefosina associada ao antimônio (Glucantime), que é o medicamento usado de rotina no tratamento da leishmaniose aqui na FMTHVD. Os tratamentos serão comparados para definir qual o melhor deles para tratar a leishmaniose.

3. Procedimentos do Estudo:

Se você concordar em participar voluntariamente, do estudo, depois de ler este consentimento na sala de consulta, uma história médica (com preenchimento de ficha constando seus dados e sobre sua doença) e um exame físico serão realizados. Serão também colhidos sangue (20ml), o equivalente a duas colheres de sopa, e material da lesão de pele para que o diagnóstico de sua doença seja confirmado e o tipo de *Leishmania* que causa sua doença seja identificada. Essas coletas serão realizadas numa sala de exames, no mesmo local ou centro de estudo onde você será examinado.

Se você for mulher e estiver em idade de poder engravidar, será realizado um exame de sangue para um teste de gravidez antes do início do estudo**.** Se você estiver grávida, não poderá participar do estudo. Se você não estiver grávida você poderá participar do estudo desde que concorde em fazer uso de algum método contraceptivo (para evitar gravidez) durante o tempo de uso do medicamento e até por dois meses após o final do tratamento. Neste caso os médicos do estudo irão orientá-la e fornecer o método contraceptivo mais conveniente para o seu caso. Se você engravidar durante o tratamento, você terá direito a acompanhamento médico até pelo menos oito semanas após o parto. Um grupo de participantes do estudo receberá a miltefosina associado ao GM-CSF sob a forma de creme para ser colocado na ferida, outro grupo usará a miltefosina associado a um creme que não tem remédio, que é chamado de placebo, o terceiro grupo receberá o antimônio (glucantime). A decisão de você usar miltefosina + GM-CSF ou miltefosina + placebo, ou antimônio (Glucantime) é feita por sorteio.

Ao iniciar o estudo, você receberá os comprimidos de miltefosina para tratamento por 28 dias e uma pomada contendo GM-CSF ou placebo, como já foi dito acima, que é uma substância que não causa dano em você, mas também não é um medicamento, ou você receberá o glucantime. A decisão sobre que tipo de tratamento que você irá receber será feita através de sorteio.

Durante e após o término do tratamento você será examinado por um médico que fará exames para confirmar a cura da doença. Mensalmente, ao longo de seis meses, serão realizados exame físico para verificar sua resposta ao tratamento e verificar se a doença não voltou. Isso é necessário para que se tenha certeza de que você ficou curado. Depois da última visita (sexto mês), a sua participação no estudo estará encerrada, mas precisaremos lhe ver mais uma vez para confirmar após mais seis meses, que continua curado. Se você não for curado você será tratado com glucantime durante 20 dias. Se você for não for curado, será retratado conforme recomendação do Ministério da Saúde, com outra medicação que dispomos neste ambulatório.

4. Participação Voluntária:
Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode recusar a participar ou desistir da participação a qualquer momento que você assim decidir. Sua recusa em participar de todo o estudo ou em parte deste, ou sua decisão de não mais participar do estudo, não afetará de modo algum qualquer tratamento que você precise na FMTHVD. Isto também não vai prejudicar suas futuras relações com a FMTHVD e com os médicos que lhe atenderam.

5. Confidencialidade:
Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial (ou seja, em momento algum seu nome ou dados seus serão revelados a não ser para equipe da pesquisa) sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe cientifica, porém na maioria das vezes será usado apenas um código de identifação no lugar do seu nome. Os resultados deste estudo serão divulgados na forma de comunicação científica (publicação em congressos e revistas científicas), não permitindo a identificação individual dos participantes.

6. Análises de riscos e benefícios:
A retirada de sangue pode provocar dor leve devido à punção com agulha. Em casos raros se acompanha de sangramento. A retirada de sangue da veia é um procedimento médico de rotina, e todos os cuidados apropriados serão tomados**.** Os riscos associados à coleta de sangue incluem formação de hematoma (marca roxa) e as vezes desmaios. As chances destes riscos são mínimas. A biópsia é um procedimento utilizado de rotina no diagnóstico da leishmaniose cutânea que implica em dor local, apenas para aplicação de anestesia para posterior retirada de fragmento pequenino de pele. O material que será utilizado é esterilizado, obedecendo todas as normas de segurança e assepsia. Poderá ocorrer sangramento em pequena quantidade. A realização da biópsia de pele será feita apenas por médicos participantes do referido projeto. Em caso de danos decorrentes da sua participação no estudo, você terá assistência médica integral e gratuita por todo tempo

que for necessário e será tratado com medicamentos ou procedimentos adequados para cada caso pelos médicos responsáveis pelo estudo, sem nenhum custo para você.

Este estudo pode trazer benefícios para você e para outros pacientes que tenham a leishmaniose cutânea. Esta doença é tratada com o Glucantime, aplicada na veia e causa reações importantes no seu organismo. Com o estudo podemos comprovar se a miltefosina é eficaz no tratamento da leishmaniose, e se a associação de miltefosina com o GM-CSF pode ser ainda melhor que a miltefosina isoladamente. O Glucantime, assim como a miltefosina, podem causar efeitos colaterais (efeitos devido seu uso), tais como pancreatite (inflamação no pâncreas), arritmias cardíacas, náuseas e vômitos, e o Glucantime pode ainda causar dor nas juntas. Você só será incluído como participante deste estudo se todos os exames estiverem normais (estes exames irão avaliar seu fígado, seus rins, pâncreas e coração). Para evitar estes efeitos colaterais, não utilizaremos doses elevadas acima do permitido e se mesmo assim você apresentar qualquer efeito colateral iremos fornecer toda a assistência médica necessária. O creme de GM-CSF pode causar irritação local. Caso isso aconteça, o GM-CSF será retirado do seu tratamento e usaremos um tratamento local contra a irritação. Todo o material coletado (sangue e biopsia de pele) será utilizado apenas neste estudo e descartado após as avaliações.

7. Custos:
Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação. Se você quiser participar do estudo, e isto lhe causar algum custo adicional isso lhe será ressarcido, pois é um direito seu, ou seja, o direito a ressarcimentos e indenizações por algum dano decorrente de sua participação neste estudo. Caso você apresente qualquer problema associado a esta pesquisa, a FMTHVD lhe dará toda assistência médica necessária em Manaus. Informação adicional pode ser obtida na Gerência de Leishmaniose da FMTHVD com Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra. Tel: (92)99988 3215, (92)2127 3555, (92)2127 3518 ou Dra. Luciana Mendes, Tel. (92)981816636.

8. Esclarecimentos e Contatos:
Se você tiver qualquer outra questão sobre a sua participação ou sobre seus direitos como participante desta pesquisa, por favor contate o Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra, nos telefones acima ou o Comitê de Ética em Pesquisa da FMTHVD Av. Pedro Teixeira, 25 D. Pedro Manaus-AM 69040000. Horário de funcionamento: Segunda a sexta e 8:00 ás 14:00h, Fone: 2127 3572, cuja presidente é Dra. Marilaine Martins, onde poderão ser esclarecidas suas dúvidas.

9. Consentimento:
Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor rubricar todas as páginas e assinar o nome abaixo**. A você será entregue uma via original deste documento para guardar e a outra ficará com o pesquisador. O pesquisador também rubricará todas as páginas e assinará esse consentimento.**

 Sim, eu concordo em participar do estudo e que a amostra de sangue e / ou pele sejam retiradas para este estudo.

 Não, eu não concordo em participar do estudo e nem que a amostra de sangue e / ou pele sejam retiradas para este estudo.

_____
Assinatura do Paciente Data Hora
Impressão do Polegar do Paciente

_____
Assinatura da Testemunha Data Hora
Impressão do Polegar da Testemunha
Compromisso do Pesquisador: Discutir as questões acima apresentadas com os participantes do estudo e ter certeza que o participante entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

_____
Assinatura do Pesquisador Data Hora.

ANEXO 8

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO
Centro de Entomologia Médica
Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000
Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP
(POP_ENTOMOLOGIA_RECRU_RETEN_001_v01)

TÍTULO: Plano de recrutamento e retenção dos participantes

Elaborado por:	**Revisado e aprovado por:**	**Data de aplicação**
Bleno Leonam Goncalves da Costa	**Luciana Mendes dos Santos**	
		Data da próxima revisão

OBJETIVO
Descrever atividades de recrutamento e retenção para o Estudo Efetividade da Associação Miltefosina e GM-CSF no Tratamento da Leishmaniose Cutânea Causada por Leishmania (Viannia) braziliensis Leishmania (Viannia) guyanensis na Região de Manaus - AM na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD, em Manaus/AM – Brasil.

DEFINIÇÕES
Incluir no mínimo 150 participantes, sendo aproximadamente 10 (dez) por semana, com taxa de retenção de 90% durante o ensaio clínico para avaliar a Efetividade da Associação Miltefosina e GM-CSF no Tratamento da Leishmaniose Cutânea Causada

por Leishmania (Viannia) braziliensis Leishmania (Viannia) guyanensis confirmado por exame parasitológico direto para leishmaniose pelo método de escarificação.

CAMPO DE APLICAÇÃO

Potenciais participantes de 18 a 65 anos que procurem a FMT-HVD para tratamento Leishmaniose Cutânea Causada por Leishmania (Viannia) braziliensis Leishmania (Viannia) guyanensis, confirmado por exame parasitológico direto para leishmaniose pelo método de escarificação. podendo ser residente na área urbana da cidade Manaus ou área rural.
Para inclusão no estudo, é necessário que os participantes atendam aos critérios abaixo descritos:

- Leishmaniose cutânea ulcerada não tratada, com diagnóstico laboratorial obtido através da identificação de parasito pelo exame direto do esfregaço da borda da lesão.
- Idade: 18 a 65 anos;
- Sexo: pacientes do sexo masculino e feminino;
- Presença de no mínimo 1 lesão ulcerada, em qualquer localização;
- Presença de no máximo 5 lesões ulceradas;
- Diâmetro das lesões variando entre 1 e 5 cm;
- Evolução clínica da doença não inferior a 1 mês e não superior a 3 meses.

Serão excluídos do estudo, aqueles que:

-Com evidência de doença subjacente grave (hepática, renal, pulmonar ou cardíaca) ou doença neoplásica maligna em atividade.
-Pacientes em uso de medicamentos imunossupressores e portadores de HIV;
-Apresentem desnutrição protéica e/ou calórica grave;
-Portadores de qualquer doença infecto-contagiosa em atividade e não-controlada, como tuberculose, hanseníase, doença fúngica sistêmica (histoplasmose, paracoccidioidomicose) ou qualquer outra condição semelhante;
-Mulheres grávidas ou que estejam amamentando;

-Mulheres em idade fértil que não aceitaram fazer uso de contraceptivo injetável durante o estudo

-Apresentem alergia ao Sb^V ou à miltefosina

-Tenham histórico de tratamento anterior para leishmaniose;

-Falta de capacidade ou de vontade de fornecer o consentimento informado (paciente e/ou/representante legal); ausência de disponibilidade para as visitas ou para cumprir os procedimentos do estudo.

RESPONSABILIDADES

Este plano aplica-se ao Investigador Principal, Coordenador do estudo e equipe multidisciplinar do centro, que participa ativamente do recrutamento e retenção. O coordenador do estudo será responsável por manter a equipe atualizada no plano de recrutamento, quando necessário.

POP´S RELACIONADOS

POP_ENTOMOLOGIA_TCLE_001_v01
POP_ENTOMOLOGIA_EXAM_DIRETO_001_v01

EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO NECESSÁRIOS

Luva de látex descartável;
Óculos de proteção.

RECUROS NECESSÁRIOS

Materiais
TCLE impresso;
Caneta;
Câmera Fotográfica;
Adesivo para identificação da lesão.

Equipamentos
Microscópio óptico comum.

Reagentes e soluções
Soro fisiológico 0,9%
Álcool 70%

PROCEDIMENTOS

Recrutamento
Da população residente em área urbana de Manaus e rural do Amazonas. O recrutamento somente no ambulatório da FMT-HVD. Serão selecionados homens e mulheres que atendam os critérios de inclusão do protocolo do estudo, e que não pretendam afastar-se da cidade durante o período de participação no estudo.
Mobilização e recrutamento:
Primeiramente os potenciais participantes serão abordados no consultório do ambulatório após o resultado positivo do exame direto para leishmaniose. Havendo o

consentimento informal, o consentimento formal poderá ocorrer no mesmo momento no consultório.

Explicar de forma clara o que se trata o TCLE, no ambulatório da FMT-HVD, os participantes serão abordadas com linguagem apropriada, sendo informadas sobre o estudo e como será sua participação no ensaio clínico e mediante sua concordância em participar do estudo, lhe será apresentado pelo profissional delegado da equipe o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, que deverá ser assinado **obrigatoriamente pelo Participante e** pelo Profissional que aplicou o TCLE, e ao final será proposto o ID de participante de acordo com a randomização. Em todo caso, se houver alguma dúvida médica, esta será esclarecida pelo profissional médico antes da assinatura do consentimento. Só então serão recrutados, quando elegíveis, no momento da consulta com o médico do estudo, no consultório de atendimento no consultório do ambulatório da FMT-HVD reservado para o Estudo. Na ocasião, serão selecionados indivíduos que atendam aos critérios de inclusão do protocolo.

Explicar detalhadamente todos os riscos e benefícios em participar do estudo;

Explicar detalhadamente todos os riscos e benefícios em participar do estudo;

Perguntar ao participante se existe dúvidas sobre o estudo clínico e responder as mesmas até que todas as dúvidas sejam respondidas e entendidas. Não deve ser assinado o TCLE enquanto houver qualquer questionamento pelo participante sem que seja feito o esclarecimento quantas vezes se façam necessário;

Após a concordância do participante em relação ao TCLE, o mesmo é assinado pelo participante e pelo membro da equipe do estudo que aplicou o TCLE, na FMT-HVD haverá sempre um Médico(a) do estudo disponível para esclarecer qualquer dúvida médica que o participante tenha;

Nos casos de participantes analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual, uma testemunha imparcial deve se fazer presente durante toda a discussão do consentimento informado e após a obtenção do consentimento verbal do participante, a testemunha deverá assinar o TCLE;

A assinatura deverá ser na presença do profissional que aplica o termo de consentimento e deverá ser datada. Tanto o profissional quanto o participante deverão assinar o TCLE em duas vias, ficando uma via no prontuário clínico e outra entregue ao participante.

O TCLE deverá ser revisado se está devidamente assinado e datado pelo participante e pelo responsável da aplicação. Depois será guardada uma via juntamente com o prontuário clínico do sujeito da pesquisa e outra via em posse do participante;

Todo o processo de consentimento deverá ser documentado em prontuário médico pelo profissional que aplicou o TCLE, com o intuito de registrar detalhadamente como o processo foi realizado para aquele participante.

Controle dos Registro

O controle da aplicação do TCLE, bem como a sua assinatura, será feito pelo Enfermeiro do Estudo após cada nova inclusão e nas monitorias da CRO.

REFERÊNCIAS

ANEXOS

TCLE

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

ASSINATURA: _____ DATA_____

Anexo – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Projeto: ESTUDO DE EFICÁCIA E EFETIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO

Nome do Projeto: ESTUDO DE EFICÁCIA E EFETIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO MILTEFOSINA E GM-CSF NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *LEISHMANIA (VIANNIA) GUYANENSIS* NA REGIÃO DE MANAUS - AM

Investigador em Manaus: Jorge Augusto de Oliveira Guerra, Médico.
 Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado - Gerência de leishmaniose
Av. Pedro Teixeira, 25 D. Pedro Manaus-AM 69040000
(92)2127 3555, (92) 99988 3215, 2127 3518.

Comitê de Ética: Comitê de Ética em Pesquisas da FMTHVD
Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado
Horário de funcionamento: Segunda a sexta e 8:00 ás 13:00h
Av. Pedro Teixeira, 25 D. Pedro Manaus-AM 69040000
Fone: 2127 3555
Nome do Paciente:
_____

1. Para ser lido por todos os participantes do estudo:
As informações a seguir descreverão o estudo e a forma como você vai participar. O investigador responderá quaisquer perguntas que você possa fazer sobre o estudo. Por favor, escute cuidadosamente e não hesite em perguntar qualquer coisa sobre as informações prestadas. Esse documento tem duas vias, e uma delas ficará com você.

2. Convite e Propósito do Estudo:
Nós estamos convidando você para participar de um estudo sobre a leishmaniose cutânea, que nós estamos fazendo na Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMTHVD). Esta doença é causada pela picada de um mosquito infectado e causa lesões na pele - Leche ou Ferida braba. Nós estamos pedindo para você participar deste estudo porque você apresenta essa doença e já foi mostrado em outros estudos que existem dois medicamentos que podem ajudar no seu tratamento: um medicamento chamado Miltefosina, e uma substancia chamada de fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos que chamamos de GM-CSF.

Assim sendo, o objetivo deste estudo é comparar a cura da leishmaniose cutânea com Miltefosina associada ao GM-CSF, a Miltefosina associada a placebo (que é uma substancia que não produz nenhum efeito em seu organismo) e também a Miltefosina associada ao antimônio (Glucantime), que é o medicamento usado de rotina no tratamento da leishmaniose aqui na FMTHVD. Os tratamentos serão comparados para definir qual o melhor deles para tratar a leishmaniose.

3. Procedimentos do Estudo:

Se você concordar em participar voluntariamente, do estudo, depois de ler este consentimento na sala de consulta, uma história médica (com preenchimento de ficha constando seus dados e sobre sua doença) e um exame físico serão realizados. Serão também colhidos sangue (20ml), o equivalente a duas colheres de sopa, e material da lesão de pele para que o diagnóstico de sua doença seja confirmado e o tipo de *Leishmania* que causa sua doença seja identificada. Essas coletas serão realizadas numa sala de exames, no mesmo local ou centro de estudo onde você será examinado.

Se você for mulher e estiver em idade de poder engravidar, será realizado um exame de sangue para um teste de gravidez antes do início do estudo**.** Se você estiver grávida, não poderá participar do estudo. Se você não estiver grávida você poderá participar do estudo desde que concorde em fazer uso de algum método contraceptivo (para evitar gravidez) durante o tempo de uso do medicamento e até por dois meses após o final do tratamento. Neste caso os médicos do estudo irão orientá-la e fornecer o método contraceptivo mais conveniente para o seu caso. Se você engravidar durante o tratamento, você terá direito a acompanhamento médico até pelo menos oito semanas após o parto. Um grupo de participantes do estudo receberá a miltefosina associado ao GM-CSF sob a forma de creme para ser colocado na ferida, outro grupo usará a miltefosina associado a um creme que não tem remédio, que é chamado de placebo, o terceiro grupo receberá o antimônio (glucantime). A decisão de você usar miltefosina + GM-CSF ou miltefosina + placebo, ou antimônio (Glucantime) é feita por sorteio.

Ao iniciar o estudo, você receberá os comprimidos de miltefosina para tratamento por 28 dias e uma pomada contendo GM-CSF ou placebo, como já foi dito acima, que é uma substância que não causa dano em você, mas também não é um medicamento, ou você receberá o glucantime. A decisão sobre que tipo de tratamento que você irá receber será feita através de sorteio.
Durante e após o término do tratamento você será examinado por um médico que fará exames para confirmar a cura da doença. Mensalmente, ao longo de seis meses, serão realizados exame físico para verificar sua resposta ao tratamento e verificar se a doença não voltou. Isso é necessário para que se tenha certeza de que você ficou curado. Depois da última visita (sexto mês), a sua participação no estudo estará encerrada, mas precisaremos lhe ver mais uma vez para confirmar após mais seis meses, que continua curado. Se você não for curado você será tratado com glucantime durante 20 dias. Se você for não for curado, será retratado conforme recomendação do Ministério da Saúde, com outra medicação que dispomos neste ambulatório.

4. Participação Voluntária:
Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode recusar a participar ou desistir da participação a qualquer momento que você assim decidir. Sua recusa em participar de todo o estudo ou em parte deste, ou sua decisão de não mais participar do estudo, não afetará de modo algum qualquer tratamento que você precise na FMTHVD. Isto também não vai prejudicar suas futuras relações com a FMTHVD e com os médicos que lhe atenderam.

5. Confidencialidade:
Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial (ou seja, em momento algum seu nome ou dados seus serão revelados a não ser para equipe da pesquisa) sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe cientifica, porém na maioria das vezes

será usado apenas um código de identifação no lugar do seu nome. Os resultados deste estudo serão divulgados na forma de comunicação científica (publicação em congressos e revistas científicas), não permitindo a identificação individual dos participantes.

6. Análises de riscos e benefícios:
A retirada de sangue pode provocar dor leve devido à punção com agulha. Em casos raros se acompanha de sangramento. A retirada de sangue da veia é um procedimento médico de rotina, e todos os cuidados apropriados serão tomados**.** Os riscos associados à coleta de sangue incluem formação de hematoma (marca roxa) e as vezes desmaios. As chances destes riscos são mínimas. A biópsia é um procedimento utilizado de rotina no diagnóstico da leishmaniose cutânea que implica em dor local, apenas para aplicação de anestesia para posterior retirada de fragmento pequenino de pele. O material que será utilizado é esterilizado, obedecendo todas as normas de segurança e assepsia. Poderá ocorrer sangramento em pequena quantidade. A realização da biópsia de pele será feita apenas por médicos participantes do referido projeto. Em caso de danos decorrentes da sua participação no estudo, você terá assistência médica integral e gratuita por todo tempo que for necessário e será tratado com medicamentos ou procedimentos adequados para cada caso pelos médicos responsáveis pelo estudo, sem nenhum custo para você.

Este estudo pode trazer benefícios para você e para outros pacientes que tenham a leishmaniose cutânea. Esta doença é tratada com o Glucantime, aplicada na veia e causa reações importantes no seu organismo. Com o estudo podemos comprovar se a miltefosina é eficaz no tratamento da leishmaniose, e se a associação de miltefosina com o GM-CSF pode ser ainda melhor que a miltefosina isoladamente. O Glucantime, assim como a miltefosina, podem causar efeitos colaterais (efeitos devido seu uso), tais como pancreatite (inflamação no pâncreas), arritmias cardíacas, náuseas e vômitos, e o Glucantime pode ainda causar dor nas juntas. Você só será incluído como participante deste estudo se todos os exames estiverem normais (estes exames irão avaliar seu fígado, seus rins, pâncreas e coração). Para evitar estes efeitos colaterais, não utilizaremos doses elevadas acima do permitido e se mesmo assim você apresentar qualquer efeito colateral iremos fornecer toda a assistência médica necessária. O creme de GM-CSF pode causar irritação local. Caso isso aconteça, o GM-CSF será retirado do seu tratamento e usaremos um tratamento local contra a irritação. Todo o material coletado (sangue e biopsia de pele) será utilizado apenas neste estudo e descartado após as avaliações.

7. Custos:
Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação. Se você quiser participar do estudo, e isto lhe causar algum custo adicional isso lhe será ressarcido, pois é um direito seu, ou seja, o direito a ressarcimentos e indenizações por algum dano decorrente de sua participação neste estudo. Caso você apresente qualquer problema associado a esta pesquisa, a FMTHVD lhe dará toda assistência médica necessária em Manaus. Informação adicional pode ser obtida na Gerência de Leishmaniose da FMTHVD com Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra. Tel: (92)99988 3215, (92)2127 3555, (92)2127 3518 ou Dra. Luciana Mendes, Tel. (92)981816636.

8. Esclarecimentos e Contatos:
Se você tiver qualquer outra questão sobre a sua participação ou sobre seus direitos como participante desta pesquisa, por favor contate o Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra, nos

telefones acima ou o Comitê de Ética em Pesquisa da FMTHVD Av. Pedro Teixeira, 25 D. Pedro Manaus-AM 69040000. Horário de funcionamento: Segunda a sexta e 8:00 ás 14:00h, Fone: 2127 3572, cuja presidente é Dra. Marilaine Martins, onde poderão ser esclarecidas suas dúvidas

9. Consentimento:
Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor rubricar todas as páginas e assinar o nome abaixo**. A você será entregue uma via original deste documento para guardar e a outra ficará com o pesquisador. O pesquisador também rubricará todas as páginas e assinará esse consentimento.**

☐ Sim, eu concordo em participar do estudo e que a amostra de sangue e / ou pele sejam retiradas para este estudo.

☐ Não, eu não concordo em participar do estudo e nem que a amostra de sangue e / ou pele sejam retiradas para este estudo.

_____
Assinatura do Paciente Data Hora
Impressão do Polegar do Paciente

_____
Assinatura da Testemunha Data Hora
Impressão do Polegar da Testemunha
Compromisso do Pesquisador: Discutir as questões acima apresentadas com os participantes do estudo e ter certeza que o participante entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

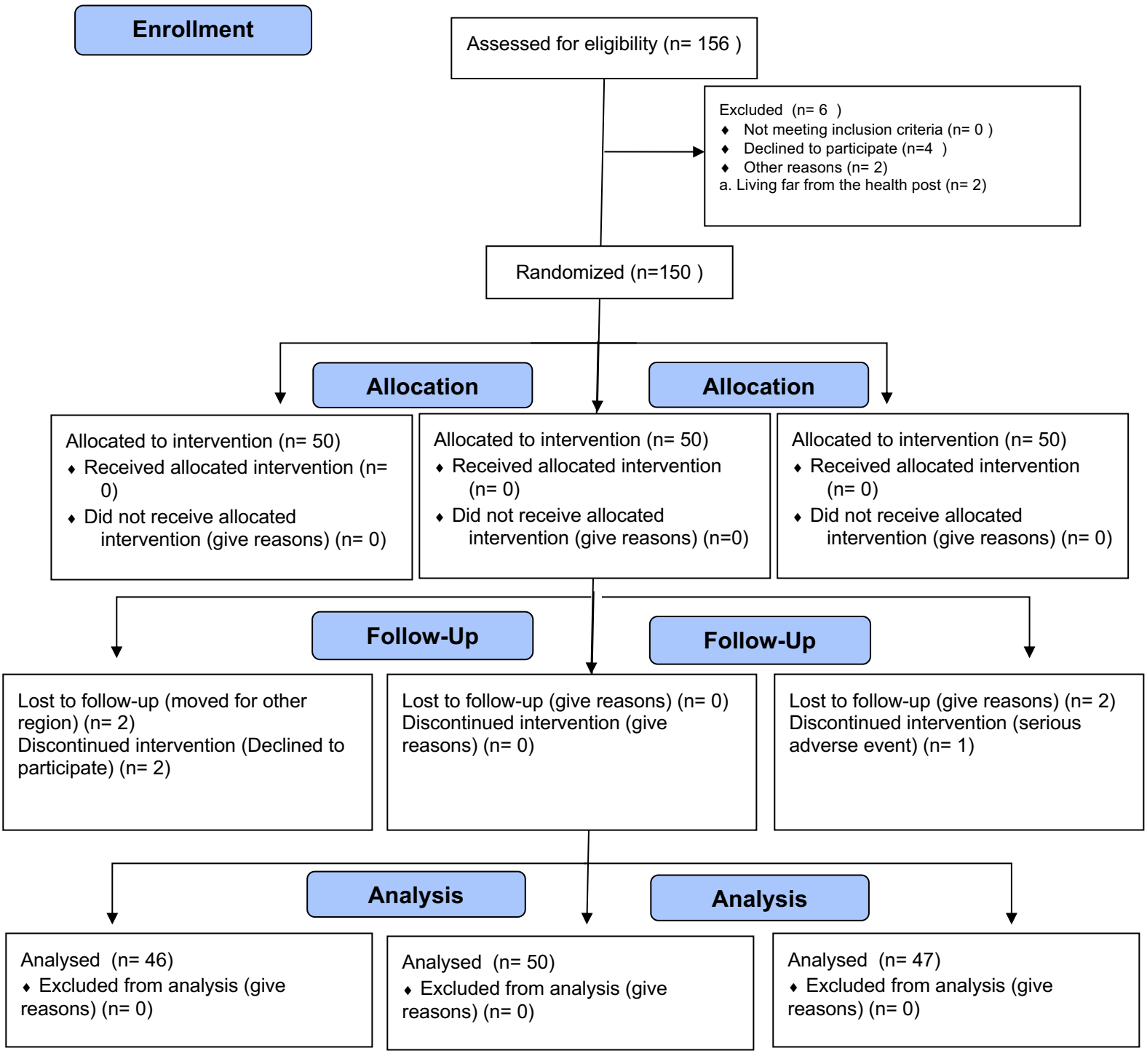
_____
Assinatura do Pesquisador Data Hora.

ANEXO 9.

CONSORT

TRANSPARENT REPORTING of TRIALS

CONSORT 2010 Flow Diagram



ANEXO 10.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE EFICÁCIA E EFETIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO MILTEFOSINA E GMCSF NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS E LEISHMANIA (VIANNIA) GUYANENSIS NA REGIÃO DE MANAUS - AM **Pesquisador:** LUCIANA MENDES DOS SANTOS **Área Temática:**
Versão: 3

CAAE: 80862417.3.0000.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: Universidade Federal da Bahia - UFBA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.509.844

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

MANAUS, 23 de Fevereiro de 2018

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador)

ANEXO 11.

Outras publicações realizadas durante o curso de doutorado

Fwd: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine - Decision on Manuscript ID RSBMT-2020-0644.R2

DC Dalmo Correia 29 de set.
Para Você, +2 ...

Attached standard file: * Copyright-Form
DOCX - 18 KB

29-Sep-2020

Dear Mrs. santos:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Chronic paronychia as a manifestation of skin leishmaniasis." in its current form for publication in the Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.

In accordance with the journal´s rules (http://www.scielo.br/revistas/rsbmt/iinstruc.htm), I kindly ask that you and your co-authors sign the attached Copyright Assignment Form and return it by e-mail in PDF format as soon as possible to

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine
Vol.:53:(e20200012): 2020
https://doi.org/10.1590/0037-8682-0012-2020

Case Report

Ramsey hunt syndrome after antimonial treatment for American Cutaneous Leishmaniasis

***Melissa de Sousa Melo Cavalcante*[1],[2], *Karina López Rodríguez*[1],[2], *José Alejandro Lazo Diéguez*[1], *Luciana Mendes dos Santos*[1],[2][3], *Maria das Graças Vale Barbosa*[1],[2] *and Jorge Augusto de Oliveira Guerra*[1],[2]**

[1]. Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM, Brasil.
[2]. Universidade do Estado do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Manaus, AM, Brasil.
[3]. Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Medicina, Manaus, Amazonas, Brasil.

Abstract

Ramsay Hunt Syndrome (RHS), also known as herpes zoster oticus, is caused by the reactivation of varicella zoster virus (VZV) in the geniculate ganglion of the facial nerve. Herein, we report a case of Ramsey Hunt Syndrome in a patient after antimonial treatment for Cutaneous Leishmaniasis. The patient presented with microvesicles grouped on an erythematous base, starting in the cervix and ascended towards the scalp margin on the right side of the head. The patient also developed grade V peripheral facial palsy the day after initiating the herpes zoster treatment, this outcome corroborated the assumption of Ramsey Hunt Syndrome.

Keywords: Leishmaniasis. Ramsay Hunt Syndrome. Herpes zoster. Facial paralysis.

INTRODUCTION

Ramsay Hunt Syndrome (RHS) was first described by James Ramsay Hunt in 1907. The syndrome is characterized by a vesicular rash on the pinna, ipsilateral otalgia, and peripheral facial palsy on the same side of the head[1]. However, it can also presents signs and symptoms such as hypoacusis, nausea, vomiting, vertigo, and nystagmus related to proximity-related eighth cranial nerve affection[2]. RHS is the second most common cause of facial paralysis, after Bell's palsy[3]. The incidence of RHS is approximately 5 cases/100,000 individuals and it primarily affects patients in the 20-30 year age group[4]. RHS is also often observed in the elderly immunosuppressed patients[5].

CASE REPORT

A 55-year-old male patient who was born in Manaus metropolitan area, in the Brazilian state of Amazonas, with no comorbidities, sought medical help at the leishmaniasis service of the Doctor Heitor Vieira Dourado Foundation for Tropical Medicine (FMT-HVD) in Manaus. He had completed treatment with a pentavalent antimonial drug for cutaneous leishmaniasis (CL) 40 days prior. A history and physical examination detected an active lesion with satellite papule in the patient's right upper limb. He received outpatient treatment with a second cycle of antimonial application for 30 days.

Ten days after the end of the treatment, the patient's leishmaniasis lesion was healed (**Figure 1**). However, it presented with *microvesicles grouped* on an *erythematous base,* starting in the cervix and ascended towards the scalp margin on the right side of the head. The *microvesicles* affected the patient's pinna, external auditory canal, and right ear lobe, and were associated with severe torticollis-like pain in the nerve path (**Figure 2**). The patient received herpes zoster treatment with the following doses: 800 mg of acyclovir every 4 hours for 7 days, 25 mg of amitriptyline every 12 hours, and 500 mg + 30 mg of paco (paracetamol + codeine phosphate). He developed grade V peripheral facial palsy the day after initiating the herpes zoster treatment; this outcome corroborated the assumption of Ramsey Hunt Syndrome (**Figure 3**). Serology tests for human immunodeficiency virus (HIV) were negative. Corticosteroids (40 mg of prednisone/day), epitezan ointment, and hourly eye lubricant applications were added to the treatment.

Corresponding author: Melissa de Sousa Melo Cavalcante.
e-mail: melfsmelo@hotmail.com
https://orcid.org/0000-0002-3231-2004
Received 3 February 2020
Accepted 19 May 2020

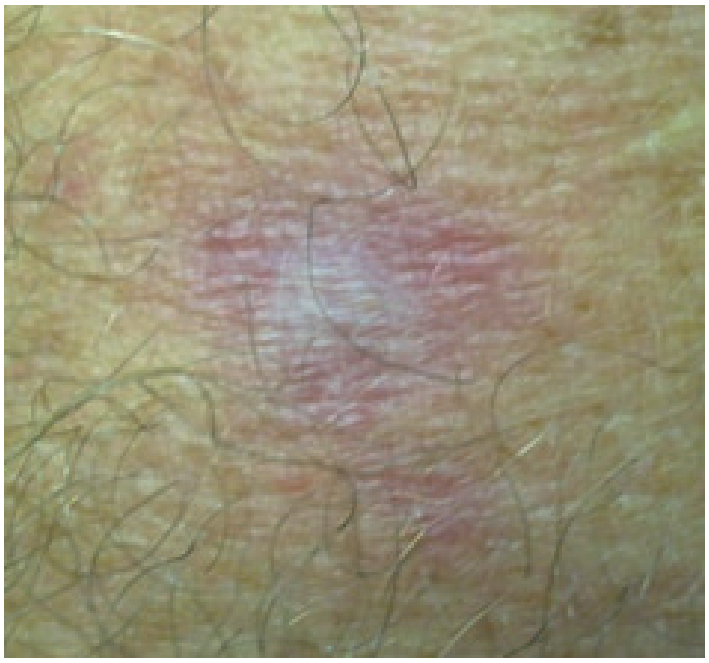


FIGURE 1: Lesion of cutaneous leishmaniasis in a initial stage of healing.

FIGURE 2: Microvesicles grouped on an erythematous-infiltrated base in the cervical region, right pinna and ear lobe, and scalp margin.

FIGURE 3: Grade V peripheral facial palsy after pentavalent antimonial treatment for cutaneous leishmaniasis.

The patient reported improvement in the cervical pain at the end of the acyclovir-based treatment; however, he continued to have persistent headache and peripheral facial palsy symptoms. Following the gradual reduction of these symptoms, he was referred to another hospital in Manaus County for motor physical therapy treatment. The eye lubricant applications and analgesic medication were maintained, and the patient was referred to the neurology service for an outpatient follow-up where he presented with full neurological recovery.

DISCUSSION

RHS, is the second most common cause of non-traumatic facial palsy in adults[4]. In addition, it is often underdiagnosed, or misdiagnosed as Bell's palsy, trigeminal neuralgia or otitis externa[4]. However, the evolution of RHS is more severe than that of Bell's palsy and only 30% of RHS-affected patients achieve full recovery[3].

Clinical diagnosis of RHS is based on the signs and symptoms although VZV-specific serology can be indicated in atypical cases[1]. Although polymerase chain reaction (PCR) enables identification of

the VZV genome[5], these techniques cannot make a quick diagnosis early in the disease course. Tzanck's cytodiagnosis is the most useful in emergency cases because of its fast application and simple interpretation. Additionally, while nuclear magnetic resonance imaging is a non-specific diagnostic technique, it is effective in assessing the prognosis of peripheral palsies[6].

RHS should be diagnosed as early as possible to enable the fast implementation of appropriate treatment and to avoid sequelae[5]. These complications include encephalitis, myelitis, and cranial and peripheral nerve palsies[2]. Early treatment with corticosteroids and antiviral drugs enables high rates of full facial nerve recovery within 6-12 months[7]. Patient characteristics, such as age, associated diseases, immunodeficiencies, and their clinical condition, can lead to a worse prognosis.

Herpes zoster association with antimonial treatment for leishmaniasis has also been reported with a possible secondary link to transient lymphopenia[8]. Hartzell et al.[9] described a patient who developed aseptic meningitis and herpes zoster secondary to varicella zoster virus (VZV) during antimonial treatment for American Tegumentary Leishmaniasis.

Any individual who has had chickenpox is susceptible to RHS. The syndrome is not contagious; however, VZV reactivation can cause chickenpox in contacts who were not previously immunized against the virus. The infection in immunodeficient patients can be severe; therefore, recommendations include avoiding physical contact with individuals in the infection stage or those who have not been vaccinated, as well as with immunosuppressed individuals, newborns, and pregnant women[6].

This report presented the case of a previously healthy patient who developed a rare VZV-associated facial palsy after treatment with antimonial drugs for cutaneous leishmaniasis. The patient's condition improved following the use of antiviral drugs and systemic corticosteroids. Early diagnosis and effective intervention resulted in the manifestation of his disease and the primary outcome was similar to the ones described in the literature.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

MSMC: conception and design of the study, Acquisition of data, Investigation, Methodology, Resources, Writing-original draft; **KLR:** Acquisition of data, Investigation, Methodology, Writing-original draft; **JALD:** Investigation, Writing-original draft; **LMS:** Investigation, Writing-original draft; **MGVB:** Supervision, Visualization, Writing-review & editing; **JAOG:** Acquisition of data, Methodology, Project administration, Supervision, Visualization, Writing-review & editing.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Magalhães MJS, Cardoso MS, Gontijo IL. Ramsay hunt syndrome-case report. Revneuropsiq. 2014;18(3):247–52. Available from: https://www.revneuropsiq.com.br/rbnp/article/view/40.

2. Carriço C. Relato de um caso de Síndrome de Ramsay Hunt. Rev Port Clin Geral. 2011;27(6):554–6. Available from: http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0870-71032011000600011&lang=pt.

3. MacLean CS, MD, PhD, Antonio MP, MD. Ramsay Hunt Syndrome with a Cranial Nerve Polyneuropathy. Proc UCLA Healthc. 2017;21:1–3. Available from: https://proceedings.med.ucla.edu/wp-content/uploads/2017/11/Ramsay-Hunt-Syndrome-with-a-Cranial-Nerve-Polyneuropathy.pdf.

4. Donati D, Santi L, Ginanneschi F, Cerase A, Annunziata P. Successful response of non-recovering Ramsay Hunt syndrome to intravenous high dose methylprednisolone. J Neurol Sci. 2012;318(1–2):160–2. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22560873.

5. Paiva ALC, Araujo JLV, Ferraz VR, Veiga JCE. Facial paralysis due to Ramsay Hunt syndrome – A rare condition. Rev Assoc Med Bras. 2017;63(4):301–2. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302017000400301.

6. Pilar M, Gallego O, María J, Ángel M, Armero T. Síndrome de Ramsay Hunt . A propósito de un caso. Rev Clín Med Fam. 2016;9(2):119–22.

7. Coulson S, Croxson GR, Adams R, Oey V, Prince ÞR, Hospital A. Prognostic Factors in Herpes Zoster Oticus (Ramsay Hunt Syndrome). Otol Neurotol. 2011;32(6):1025-30. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21725270.

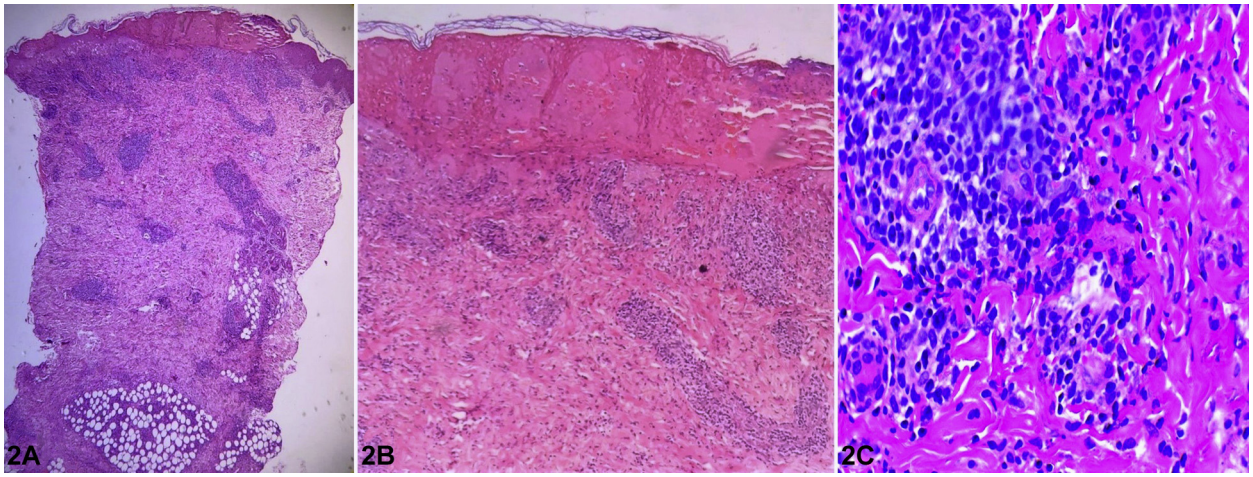
8. Wortmann GW, Aronson NE, Byrd JC, Grever MR, Oster CN. Herpes zoster and lymphopenia associated with sodium stibogluconate therapy for cutaneous leishmaniasis. Clin Infect Dis. 1998;27(3):509-12. Available from: https://academic.oup.com/cid/article/27/3/509/280745.

9. Hartzell JD, Aronson NE, Nagaraja S, Whitman T, Hawkes CA, Wortmann G. Varicella zoster virus meningitis complicating sodium stibogluconate treatment for cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2006;74(4):591-2. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16606989.

OPEN ACCESS
https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Cutaneous manifestations of severe systemic disease in children

Cleide Garbelini-Lima Forneck, MD, Monique Freire Santana, MD,
Vanine de Lourdes Aguiar Lima Fragoso, MD, Virginia Vilasboas Figueiras, MD, and
Luciana Mendes dos Santos, MD
Manaus, Amazonas, Brazil



A 4-year-old girl is being evaluated for an eruption that has been evolving for 2 years. Vesicles, papules, and necrotic ulcers with crusts are noted, progressing to disseminated varioliform scars associated with recurrent fever, facial edema, and lymphadenopathy (Figs 1*A*, 1*B*, and 1*C*). The lesions occurred initially in photoexposed areas and have progressed to non-photoexposed regions. Histopathologic examination of the skin with routine staining shows a crust associated with keratinocyte necrosis, accentuated angiocentric lymphocytic inflammatory infiltrate, which extends to the hypodermis, and atypical lymphocytes with epidermotropism (Figs 2*A*, 2*B*, and 2*C*). Immunohistochemistry (Figs 3*A*, 3*B* and 3*C*) confirms the diagnosis. Bone marrow biopsy findings are normal.

Based on the clinical presentation and histologic findings, what is the most likely diagnosis?

1. Actinic prurigo

2. Bullous systemic lupus erythematosus

3. Hydroa vacciniforme

4. Erythropoietic protoporphyria

5. Hydroa vacciniforme-like lymphoproliferative disorder

Click here to view disclosures, take the quiz, and claim CME credit.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

From the Tropical Medicine Foundation - Dr. Heitor Vieira Dourado.

Funding: None.

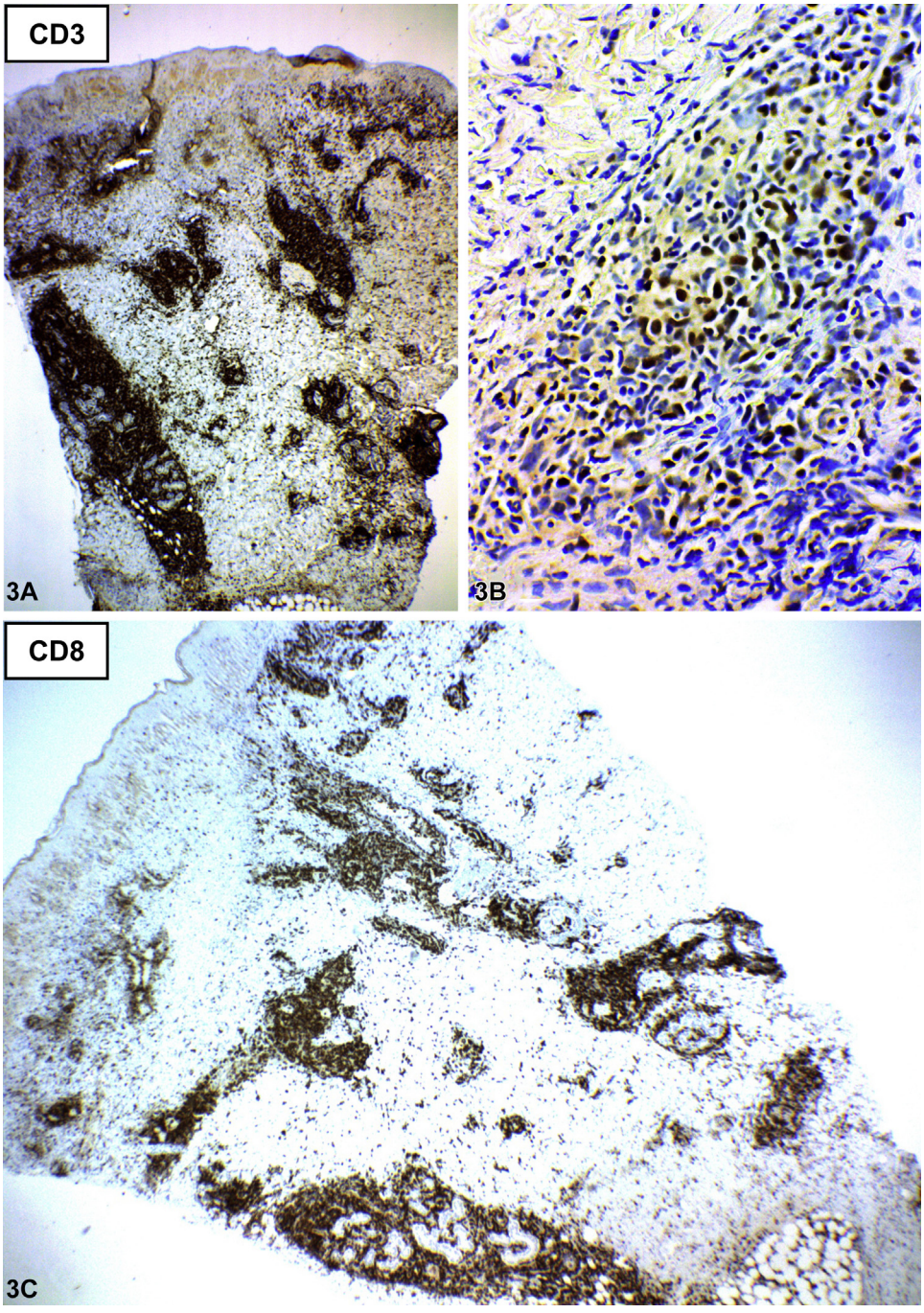
IRB approval status: Not applicable.

Correspondence to: Cleide Garbelini-Lima Forneck, MD, Avenida Pedro Teixeira, 2292, Condomínio Thiago de Mello, Apto 1204, Torre B. Manaus, Amazonas CEP:69.040-000, Brazil. E-mail: cle_garbelini@hotmail.com.

JAAD Case Reports 2021;7:143-5.
2352-5126

© 2020 by the American Academy of Dermatology, Inc. Published by Elsevier, Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

https://doi.org/10.1016/j.jdcr.2020.06.047


CD3
3A
3B
CD8
3C