



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA**
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE**



**Análise do tropismo de *Leishmania braziliensis*
para a mucosa nasal antes e longo período
após o tratamento da leishmaniose cutânea
localizada.**

Amanda Canário Andrade Azevedo

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2017.

A994 Azevedo, Amanda Canário Andrade

Análise do tropismo de *Leishmania braziliensis* para a mucosa nasal antes e longo período após o tratamento da leishmaniose cutânea localizada./Amanda Canário Andrade Azevedo – Salvador: A. Azevedo, 2017.

VIII, 103p.: il.

Orientadora: Prof. Dra. Viviane Boaventura

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde / Faculdade de Medicina da Bahia / Universidade Federal da Bahia, 2017.

1. Leishmaniose mucocutânea; 2. Mucosa nasal; 3. *Leishmania braziliensis*; 4. Reação em cadeia de polimerase. I. De Oliveira, Viviane Sampaio Boaventura. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.828.5



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE**



Análise do tropismo de *Leishmania braziliensis*
para a mucosa nasal antes e longo período após o
tratamento da leishmaniose cutânea localizada.

Amanda Canário Andrade Azevedo
Professor-orientador: Viviane Boaventura
Professor co-orientador: Aldina Barral

Dissertação apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, da área de concentração em Medicina.

Salvador (Bahia), 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- Prof. Dra. Viviane Boaventura, médica otorrinolaringologista – Doutora em Patologia – Universidade Federal da Bahia / Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz / FIOCRUZ (presidente).
- Prof. Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus - Doutora em Imunologia – Universidade Federal de Sergipe.
- Prof. Dr. Washington Luis Conrado dos Santos – Doutor em Patologia – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz / FIOCRUZ.

Membro suplente:

- Prof. Dra. Isadora Cristina de Siqueira, médica infectologista – Doutora em Patologia – Universidade Federal da Bahia / Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz / FIOCRUZ.

“De tudo, ficaram três coisas.

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro..."

Fernando Pessoa

À Deus, pela graça e misericórdia.

Ao meu esposo, Henrique, pela compreensão e cuidado.

Ao meu príncipe, Henriquinho, pelos sorrisos e força para continuar.

Aos meus pais, Lásaro e Petinha, e meu irmão, Lucas, por todo amor e
incentivo.

FONTES DE FINANCIAMENTO

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)
- Bolsa de estudo da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

AGRADECIMENTOS

À Dra. Viviane Boaventura e Dra. Aldina Barral, pela orientação, incentivo, ensinamentos, compreensão e por acreditarem no meu potencial.

Aos colegas médicos otorrinolaringologistas Michelle Queiroz, Gustavo Barreto, Thiago Cavalcante e Grasielle Figueiredo, do serviço de Otorrinolaringologia da Santa Casa de Misericórdia da Bahia, pela ajuda na avaliação aos pacientes e pela amizade e companhia nas inúmeras viagens à área endêmica.

A Vanessa Salgado pela amizade, disponibilidade e ajuda com os procedimentos no laboratório.

À enfermeira Geisa Barreto da Silva, por toda disponibilidade e ajuda fundamental na busca ativa aos pacientes e organização dos atendimentos.

À colega médica, Thaizza Cavalcante Correia, pela ajuda no atendimento clínico aos pacientes com leishmaniose cutânea.

Ao colega Dr. Almério Libório Lopes de Noronha pela leitura das lâminas de histopatologia.

Aos pacientes que aceitaram participar desse estudo.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, à secretária do PPgCS, Ana Cibele e a todos os professores e funcionários.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz/FIOCRUZ e a Universidade Federal da Bahia.

ÍNDICE

Índice de tabelas	11
Índice de figuras	12
I. RESUMO	13
II. OBJETIVOS	14
III. INTRODUÇÃO	15
IV. REVISÃO DA LITERATURA	18
IV.1. Leishmanioses – Considerações gerais	18
IV.2. Leishmaniose Mucosa	20
IV.3. Leishmaniose Cutânea	24
IV.4. Leishmaniose Tegumentar – exames complementares	26
IV.5. Leishmaniose Tegumentar – tratamento	29
V. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	32
V.1. Desenho de estudo	32
V.2. Critérios de inclusão	33
V.3. Critérios de não inclusão	33
V.4. Diagnóstico	34
V.4.1. Leishmaniose Cutânea Localizada	34
V.4.2. Leishmaniose Mucosa	34
V.5. Coleta do swab nasal	35
V.6. Tratamento LCL	35
V.7. Critérios de cura para LCL	36
V.8. Cálculo amostral	36
V.9. Extração do DNA	36
V.10. PCR convencional – primer 150/152 (PCR150/152)	37
V.11. PCR em tempo real (qPCR)	37
V.12. Clonagem e sequenciamento	38
V.13. Análise estatística	39
V.14. Aspectos éticos	39
VI. ARTIGO	41
VII. RESULTADOS GERAIS	
VII.1. Caracterização dos grupos de LCL aguda e de passado de tratamento para LCL	63
VII.2. Detecção de parasita em amostra de swab nasal de LCL aguda e de passado de tratamento para LCL	64
VII.3. Caracterização dos pacientes com LCLA com e sem parasite detectável na mucosa nasal	65
VII.4. Caracterização dos pacientes com LCLP com parasita detectável na mucosa nasal	66
VII.5. Caracterização dos pacientes com LCLP sem parasita detectável na mucosa nasal	69
VIII. DISCUSSÃO	71
IX. PERSPECTIVAS DE ESTUDO	78
X. CONCLUSÕES	79
XI. SUMMARY	80

XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXOS	
Anexo 1 (Ficha clínica de atendimento otorrinolaringológico)	90
Anexo 2 (Parecer CEP número 484908)	91
Anexo 3 (Parecer CEP número 477854)	93
Anexo 4 (Termo de consentimento livre e esclarecido)	95
Anexo 5 (Submission Guidelines for PLOS Neglected Tropical Diseases)	97

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características clínico-epidemiológicas dos pacientes avaliados. 63

Tabela 2. Características dos pacientes com LCL aguda. 65

Tabela 3. Pacientes com LCL aguda e PCR swab nasal positivo. 66

Tabela 4. Características clínicas e epidemiológicas dos indivíduos com passado de LCL. 67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de casos de leishmaniose mucosa no Brasil de 2007 a 2015. Fonte: SINAM, 2016.	20
Figura 1. Lesão mucosa inicial dos 2 pacientes com LM.	68
Figura 2. Alinhamento de sequências múltiplas.	69
Figura 3. Avaliação otorrinolaringológica dos pacientes com passado de LCL.	70

I. RESUMO

ANÁLISE DO TROPISMO DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* PARA A MUCOSA NASAL ANTES E LONGO PERÍODO APÓS O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE LOCALIZADA. INTRODUÇÃO: *Leishmania sp.* pode estar presente na mucosa nasal na leishmaniose cutânea localizada (LCL) aguda, com redução logo após o tratamento. No entanto, permanece desconhecido se a redução na persistência do parasita e lesão mucosa podem ser reduzidos longo período após tratamento adequado. **OBJETIVO:** Comparar a frequência de detecção de *Leishmania* em mucosa nasal de pacientes com LCL aguda e com passado de LCL tratada. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Estudo de corte transversal com avaliação otorrinolaringológica de grupo com LCL aguda (LCLA), antes de tratamento, com 157 indivíduos, e grupo com passado de LCL tratada (LCLP), com 333 indivíduos. Pacientes do grupo LCLP foram tratados com droga leishmanicida, com cura clínica registrada em prontuário por infectologista. Amostras de swab nasal foram coletadas de todos os pacientes e feito PCR. Biópsia nasal foi realizada naqueles com lesão mucosa suspeita. **RESULTADOS:** No grupo LCLA houve positividade de 7,6% no PCR das amostras de swab nasal, enquanto no grupo LCLP foi de 0,9% ($p=0,001$), após mediana de 5 anos desde o episódio passado de LCL com tratamento e cicatrização completa da úlcera cutânea. Pacientes com PCR positivo no grupo LCLA precisaram de mais ciclos de Glucantime® para alcançar cura clínica quando comparados àqueles com PCR negativo no mesmo grupo ($p<0,05$) e evoluíram mais frequentemente para formas atípicas de LCL como recidiva cutis e/ou leishmaniose disseminada ($p<0,05$). Dos 333 pacientes com passado de LCL tratada com droga leishmanicida, foram identificados 2 casos (0,6%) com lesão mucosa ativa causada por *Leishmania*, 20 e 11 anos após episódio de LCL. Apresentavam lesões iniciais, restritas à mucosa nasal, com epístaxe, hiperemia, crostas e aspecto granuloso, e apresentaram o PCR da amostra de swab nasal positivo. Parasita foi identificado na histopatologia em um desses casos e o sequenciamento genético confirmou *Leishmania braziliensis*. **CONCLUSÃO:** Há tropismo da *Leishmania* para mucosa nasal na LCL aguda, principalmente entre indivíduos que foram resistentes ao tratamento e evoluíram para formas atípicas da LCL. Longo período após tratamento adequado da LCL detectou-se parasita na mucosa nos casos com LM ativa.

Palavras-chave: 1. Leishmaniose mucocutânea; 2. Mucosa nasal; 3. *Leishmania braziliensis*; 4. Reação em cadeia de polimerase

II. OBJETIVOS

GERAL

Comparar a frequência de detecção de antígeno de *Leishmania sp.* na mucosa nasal de pacientes com LCL ativa e de indivíduos com passado de tratamento completo para LCL.

SECUNDÁRIOS

- Verificar a frequência e características dos casos de LCL ativa e de passado de tratamento para LCL que apresentam parasita em amostras de swab nasal.
- Identificar e caracterizar os casos de LM entre os indivíduos tratados para LCL.

III. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma protozoonose responsável por um amplo espectro de doenças, incluindo a leishmaniose tegumentar americana (LTA) (ASHFORD, 2000; HERWALDT, 1999). Apesar de haver evidência científica de progresso no campo da imunopatogênese e biologia celular da LTA, a doença ainda persiste como um importante problema de saúde pública (DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015; HOTEZ et al., 2006, 2004).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a apresentação clínica mais frequente, podendo a leishmaniose mucosa (LM) ocorrer em torno de 3 a 6% dos casos, causando lesões destrutivas e doença potencialmente letal (MARSDEN et al., 1984). A doença mucosa geralmente envolve o nariz, podendo comprometer faringe e laringe, sendo detectada em torno de 3 anos após diagnóstico da doença cutânea (MARSDEN et al., 1984). No entanto, as circunstâncias que levam à lesão mucosa ainda são desconhecidas.

Foram propostos alguns fatores de risco para a leishmaniose mucosa. Entre eles lesão cutânea acima da cintura pélvica, de diâmetro maior do que 4 cm, com tempo de evolução maior do que 4 meses, má nutrição severa e tratamento inadequado da lesão cutânea (BLUM et al., 2012; JONES et al., 1987; LLANOS-CUENTAS et al., 1984b; MACHADO-COELHO et al., 2005; MARSDEN et al., 1984). Dentre eles o tratamento inadequado da lesão cutânea, com droga não recomendada ou por tempo ou dose inferiores ao recomendado, pode ser potencialmente modificado após o diagnóstico da doença cutânea.

Foi demonstrado que a *Leishmania sp.* pode ser detectada em tecido mucoso aparentemente livre de qualquer patologia, sem alterações ao exame físico, em pacientes com LCL ativa. Amostras de swab nasal desses pacientes foram positivas para *Leishmania sp.* em 57% através da reação de polimerase em cadeia (PCR) isoladamente, aumentando para 92% quando adicionada a hibridização por *Southern Blot* (FIGUEROA et al., 2009). Foram testadas amostras de swab de mucosa nasal, de tonsilas palatinas e conjuntival, destas a mais frequentemente positiva foi a mucosa nasal. Quando analisada a localização da lesão cutânea (face/cabeça e pescoço ou membros inferiores/superiores) não houve relação com a detecção da *Leishmania sp.* nos tecidos mucosos, sugerindo que o sítio da lesão cutânea não está relacionado com a ocorrência de lesão mucosa. Então, se já há parasita no tecido mucoso sem lesão macroscópica, visível ao exame físico, poderia o tratamento adequado da LCL (droga, dose e tempo conforme recomendações da literatura) eliminar/destruir a *Leishmania sp.* e portanto diminuir o risco de LM? Valencia *et al.* (MARTÍNEZ-VALENCIA et al., 2017) encontraram positividade de 45% no PCR de amostras de swab de mucosa (nasal e palatina) de indivíduos com LCL ativa e de 3,3% 13 semanas após o tratamento.

Os sintomas iniciais da LM são obstrução nasal, rinorréia e sangramento nasal (epistaxe) (MARSDEN et al., 1984). Podem ser encontrados no exame físico edema da mucosa nasal e lesão granulosa nos estágios iniciais da doença, podendo evoluir num quadro tardio para perfuração do septo nasal, espessamento da pele nasal e grandes deformidades na face. Os achados de exame físico podem estar recobertos

por exsudato mucopurulento e crostas no caso de infecção secundária e podem ser comuns a diversas doenças infecciosas e inflamatórias, tornando difícil o diagnóstico diferencial (BOAVENTURA et al., 2009). Portanto, para o diagnóstico da LM, é preciso uma somatória de dados epidemiológicos, clínicos e exames complementares (GOTO; LINDOSO, 2010).

Buscamos portanto verificar a presença de DNA de *Leishmania sp.* na mucosa nasal clinicamente saudável de indivíduos com LCL aguda e longo período após episódio de LCL adequadamente tratada pelo nosso grupo e acompanhados até a cura clínica da lesão cutânea. E identificar e caracterizar os casos com LM entre os com história de LCL tratada.

IV. REVISÃO DE LITERATURA

IV.1. Leishmanioses – Considerações gerais

A leishmaniose é causada pelo protozoário *Leishmania sp.*, parasita intracelular obrigatório, pertencente à família *Trypanosomatidae*, transmitida pela picada do flebotomíneo fêmea infectado. Há três formas principais de leishmaniose, a visceral (também conhecida como kalazar, é a forma mais grave da doença) e a tegumentar (cutânea, a mais comum, e mucosa). Há estimativa, segundo a Organização Mundial da Saúde, de 700000 a 1 milhão de novos casos de 20000 a 30000 mortes anualmente. Está amplamente distribuída em todo o mundo, com pelo menos 97 países e territórios considerados endêmicos para leishmaniose (WHO, 2017a, 2017b).

A *Leishmania sp.* apresenta duas formas principais, uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos do hospedeiro vertebrado. No Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2007). As três principais são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonenses*. A *L. (V.) braziliensis* é a espécie mais importante, não só no Brasil, mas em toda a América Latina. Está amplamente distribuída em todo o país e é principal responsável pelos casos de LTA na Bahia.

Os vetores da LTA são insetos flebotomíneos, pertencentes à Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Lutzomyia*.

A transmissão se dá através da picada de insetos transmissores infectados e período de incubação da doença no ser humano é, em média, de dois a três meses. A forma reprodutora, não infectante (procíclica), passa por um processo de metaciclogênese no intestino dos insetos vetores pelo qual deixam de se reproduzir e tornam-se infectantes (promastigota metacíclica). A forma promastigota metacíclica é regurgitada então para a faringe e cavidade bucal do vetor de onde são transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo. Já no hospedeiro, ao passar para o meio intracelular, se transforma em amastigota. Sua presença no interior dos macrófagos faz com que o controle da infecção necessite da resposta imune mediada por células. A manifestação clínica da doença irá depender não somente da espécie de *Leishmania sp.* envolvida, como também do estado imunológico do indivíduo infectado, resultando em um espectro de formas clínicas que inclui a leishmaniose cutânea (localizada - LCL-, cutânea disseminada - LCD -, cutânea difusa - LD) e a leishmaniose mucosa (LM).

IV.2. Leishmaniose mucosa

No Brasil há distribuição de casos de LM em todas as regiões, com ocorrência relativamente constante nos últimos 9 anos de acordo com dados do Sinam, 2016 (Figura I). sendo as regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste as que apresentaram maior frequência de casos notificados de LM nos últimos 9 anos.

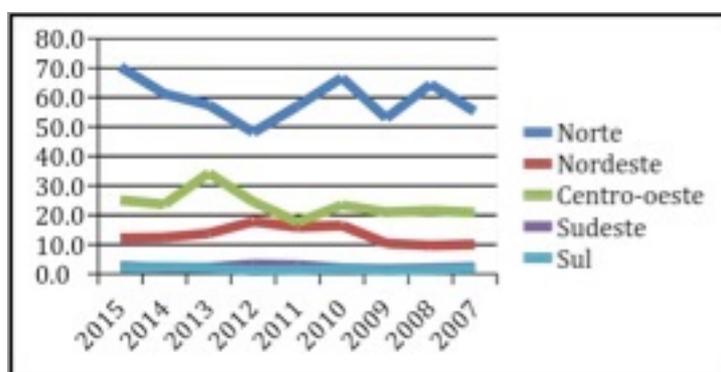


Figura I. Distribuição de casos de leishmaniose mucosa no Brasil de 2007 a 2015. Fonte: SINAM, 2016.

Historicamente é reconhecido que cerca de 3 a 6% dos casos de LCL irão desenvolver LM, que pode ocorrer de forma concomitante ou tardia (BOAVENTURA et al., 2006; MARSDEN et al., 1984). A doença mucosa pode ocorrer desde 6 meses até décadas após resolução de um quadro cutâneo. Em média, os casos de LM são identificados de três a quatro anos após a LCL, com 46% ocorrendo antes do segundo ano (MARSDEN et al., 1984).

Alguns estudos foram realizados na tentativa de identificar os indivíduos com LCL sobre risco de desenvolver a forma mucosa. Machado-Coelho *et al.* identificaram fatores como sexo masculino, idade >22 anos e má nutrição grave em maior frequência entre os pacientes que

desenvolveram LM (MACHADO-COELHO et al., 2005), embora a própria lesão mucosa possa interferir na nutrição do paciente e justificar essa associação. Adicionalmente, fatores relacionados à infecção cutânea primária parecem influenciar no aparecimento de metástase mucosa: tempo de evolução prolongado antes de iniciar a terapia (>4 meses), presença de úlceras múltiplas, extensas ou localizadas acima da cintura pélvica (LLANOS-CUENTAS et al., 1984b; MACHADO-COELHO et al., 2005) e o tratamento ausente ou inadequado da lesão cutânea (JONES et al., 1987; LLANOS-CUENTAS et al., 1984b; MARSDEN et al., 1984). Sobre esse último, Marsden *et al.* sugeriram que o atraso na cicatrização da lesão cutânea favorece a disseminação do parasita para a mucosa (MARSDEN et al., 1984).

O principal sítio acometido na LM é o nariz (DE OLIVEIRA-NETO et al., 2000; MARSDEN et al., 1984; OLIVEIRA et al., 2005), 100% dos casos são afetados quando há múltiplas lesões mucosas e 92% em casos com lesão única (MARSDEN et al., 1984). O aspecto da lesão varia de acordo com o momento em que é feito o diagnóstico. Em lesões iniciais pode-se encontrar áreas bem localizadas, circunscritas, com hiperemia, edema, erosão e/ou aspecto granuloso, sem destruição da cartilagem septal (BOAVENTURA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2005). Em lesões prolongadas pode-se encontrar grande destruição da cartilagem septal, com envolvimento da faringe e laringe, até lesões desfigurantes com queda da base da pirâmide nasal formando o nariz de tapir (MARSDEN et al., 1984; OLIVEIRA et al., 2005). Os pacientes tendem a permanecer assintomáticos por longos períodos. As queixas clínicas nasais iniciais podem ser sangramento nasal

(epistaxe), rinorréia persistente, obstrução nasal intermitente, formação de crostas e sua eliminação ocasional (MARSDEN et al., 1984). O olfato em geral não está comprometido, mas muitos pacientes queixam de irritação nasal (MARSDEN et al., 1984). Contudo, o diagnóstico de LM baseado apenas nos sintomas nasais leva a superestimação no número de casos de LM (BOAVENTURA et al., 2009). De 44 pacientes com suspeita de LM após exame clínico geral, o diagnóstico foi confirmado em apenas 13 pacientes (30%). Os outros diagnósticos (rinite alérgica, atrófica, desvio septal, rinossinusite crônica com e sem polipose) foram sugeridos após avaliação otorrinolaringológica (BOAVENTURA et al., 2009).

Clinicamente a LM pode se assemelhar ainda a outras doenças granulomatosas como a hanseníase, sarcoidose, granulomatose com poliangeíte (granulomatose de Wegener). Elas podem apresentar quadro nasossinusal de características semelhantes à leishmaniose mucosa, o que torna o diagnóstico diferencial baseado apenas em dados clínicos difícil.

A hanseníase é doença granulomatosa infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*. Em estudo retrospectivo que analisou prontuários de 173 pacientes com hanseníase (MARTINS; DE CARVALHO E CASTRO; MOREIRA, 2005) observou-se que 70% apresentavam queixas de sintomas nasais, sendo que em muitos deles não houve correlação entre sintomas nasais e apresentação clínica da hanseníase. Os sintomas nasossinusais mais comuns foram, em ordem decrescente, obstrução nasal, epistaxe, crostas, rinorréia e hiposmia (MARTINS; DE CARVALHO E CASTRO; MOREIRA, 2005). E os achados de exame físico nasal foram principalmente infiltração da mucosa nasal (80,9%), lesão de aspecto granuloso (46,8%),

ressecamento nasal (38,7%), vasculite (38,7%), crostas (31,2%), palidez (28,9%), hiperemia (23,7%), ulceração (19,7%) e atrofia (13,3%) (MARTINS; DE CARVALHO E CASTRO; MOREIRA, 2005).

A sarcoidose é doença granulomatosa sistêmica de etiologia desconhecida. O envolvimento nasal é incomum (MEYBECK et al., 2004; ZEITLIN et al., 2015) e na maioria dos pacientes com sarcoidose nasossinusal já há diagnóstico estabelecido de sarcoidose, especialmente doença pulmonar (BRAUN; GENTINE; PAULI, 2004; REED, 1996). No entanto, a doença nasossinusal também pode ser o sintoma inicial da sarcoidose (AUBART et al., 2006; WILSON et al., 1988). As queixas nasais mais comuns são sintomas de rinosinusite crônica, obstrução nasal e formação de crostas (LAWSON; JIANG; CHENG, 2014). No exame físico são mais comumente encontrados crostas (64%), perfuração septal (29%), mucosa hipertrófica (25%), sinéquias (14%), mucosa congesta (7%), lesão granulosa (7%) e necrose (LAWSON; JIANG; CHENG, 2014).

A granulomatose de Wegener é uma inflamação necrotizante e vasculite que pode envolver qualquer parte do organismo, sendo característica marcante o envolvimento principalmente do trato respiratório superior e inferior e rins (CANNADY et al., 2009). A doença nasossinusal é a manifestação mais comum da granulomatose de Wegener (CANNADY et al., 2009). O envolvimento nasossinusal ocorre em torno de 89% dos indivíduos (CANNADY et al., 2009). Os sintomas e sinais mais comuns são formação de crostas, obstrução nasal e epistaxe e sinais de rinosinusite crônica, perfuração septal, deformidade nasal em sela, mucocele e pseudotumor orbitário (CANNADY et al., 2009).

IV.3. Leishmaniose Cutânea

A LCL é a forma mais prevalente da leishmaniose. A lesão da LCL surge geralmente no local do corpo onde ocorreu a picada do mosquito vetor da leishmaniose como uma pequena hiperemia, que evolui para pápula e depois um nódulo que progressivamente evolui em período de 2 semanas a 6 meses até a úlcera característica da LCL (LLANOS-CUENTAS et al., 1984a). Apresenta-se em 87% (LLANOS-CUENTAS et al., 1984a) dos casos como úlcera indolor, de formato arredondado, bem circunscrita, com bordas elevadas, endurecidas e eritematosas, com crosta central que pode ser hemorrágica (GOTO; LINDOSO, 2010; JONES et al., 1987; LLANOS-CUENTAS et al., 1984a). Parece haver relação entre o tamanho da úlcera e o tempo de evolução da LCL, com lesões de 4cm de maior diâmetro em após um a dois meses de evolução (LLANOS-CUENTAS et al., 1984a). Podem ocorrer de uma a dez lesões que podem estar no mesmo segmento do corpo ou em segmentos adjacentes (GOTO; LINDOSO, 2010; LLANOS-CUENTAS et al., 1984a). Após cura clínica pode permanecer cicatriz hipopigmentada, com pele lisa e fina no local da úlcera (GOTO; LINDOSO, 2010). Após período variável de meses a anos, a lesão cutânea pode cicatrizar no centro enquanto na borda surge uma lesão papular - leishmaniase recidiva cutis (LRC) (GOTO; LINDOSO, 2010).

Em alguns casos a lesão cutânea manifesta-se como múltiplas lesões, de 10 a 300, de aspecto acneiforme e papular, em duas ou mais áreas não contíguas do corpo, envolvendo com frequência a face e tronco, que é classificada como LCD (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2007; GOTO;

LINDOSO, 2010; REITHINGER et al., 2007). Tanto a LCD quanto a LRC têm menor resposta ao tratamento convencional com Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina) quando comparada com a LCL. Para a LCD o acometimento da mucosa de forma concomitante à lesão cutânea é mais frequente (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2007). O diagnóstico diferencial é importante pois doenças com outras causas mas com espectro clínico semelhante são comuns em áreas endêmicas para leishmaniose (REITHINGER et al., 2007). É importante afastar doenças cutâneas fúngicas (esporotricose, blastomicose, lobomicose, histoplasmose, cromoblastomicose) e bacterianas (micobacterioses atípicas, sífilis, hanseníase, pioderma gangrenoso, granuloma de linha média), úlceras relacionadas a anemia falciforme e estase venosa, sarcoidose, sarcoma de Kaposi, carcinoma espinocelular e basocelular, linfoma cutâneo de células B, etc (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2007; DAVID; CRAFT, 2009; JONES et al., 1987; REITHINGER et al., 2007).

IV.4. Leishmaniose Tegumentar – Exames complementares

Além do aspecto clínico e epidemiológico, o diagnóstico da LTA é complementado pela avaliação da resposta imune ao antígeno parasitário ou da identificação do agente etiológico. A avaliação indireta da infecção pela *Leishmania sp.* é feita pela análise da resposta imune celular e humoral ao antígeno parasitário. A intradermorreação de montenegro (IDRM) é um teste de hipersensibilidade tardia anti-*Leishmania*, que avalia a resposta celular ao antígeno do parasita. No teste de IDRM é injetado 0,1mL do antígeno de *Leishmania sp.* no antebraço do paciente e se a endureção no local, após 48-72 horas da aplicação, for maior ou igual a 5mm o resultado é considerado positivo. O teste pode persistir positivo após o tratamento para LCL (REED, 1996; SASSI et al., 1999; SHAW; LAINSON, 1975). A IDRM tem seu valor diagnóstico questionável para uso em indivíduos que residem em áreas endêmicas para leishmaniose (GOTO; LINDOSO, 2010). A reação foi positiva em 75% dos indivíduos não infectados, sem manifestações da doença no passado, residindo em área endêmica (SASSI et al., 1999). Entretanto, é amplamente utilizado por ter alta sensibilidade. Indivíduos com LM apresentam resultados significativamente maiores que aqueles com LC (SHAW; LAINSON, 1975). Em indivíduos com LCL a positividade varia entre 82-89% (REED, 1996; SASSI et al., 1999; SHAW; LAINSON, 1975) enquanto para LM está em torno de 100% (AMATO et al., 2009; SHAW; LAINSON, 1975). A sensibilidade e especificidade pode variar de acordo com a composição do teste, já que é produzido com antígenos brutos do parasita. Adicionalmente, as espécies utilizadas para a preparação do antígeno variam

entre os países e laboratórios envolvidos na sua fabricação.

Os testes sorológicos avaliam a resposta imune humoral anti-leishmania. Os mais comumente usados para o diagnóstico de leishmaniose são a imunofluorescência indireta (IFI) e o ELISA (GOTO; LINDOSO, 2010). São potenciais ferramentas para auxiliar no diagnóstico mas não muito utilizadas devido à sensibilidade variável, dependente do tipo, fonte e pureza do antígeno utilizado (KAR, 1995), além da possibilidade de reação cruzada com outros microorganismos, p.ex.: *Trypanossoma sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Plasmodium sp.* e *Schistosoma sp.* (KAR, 1995). Os testes sorológicos apresentam sensibilidade maior para pacientes com LM (GUIMARÃES et al., 1989), de 98,33% com ELISA e 84,85% com IFI (AMATO et al., 2009).

O diagnóstico parasitológico confirma a infecção pela *Leishmania sp.* que pode ser identificada através de exame histopatológico, imunohistoquímica e/ou PCR. No exame histopatológico da lesão mucosa há um intenso infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares, podendo ocorrer granulomas e áreas de necrose. A identificação da *Leishmania sp.* é rara no exame histopatológico da LM e ocorre em cerca de 30-50% dos casos com LCL ativa (SCHUBACH et al., 2001; WEIRATHER et al., 2011). A positividade para diagnóstico de LCL aumenta para em torno de 41,4% com a imunofluorescência e 58,5% com a imunohistoquímica (SCHUBACH et al., 2001).

Os métodos moleculares de detecção de antígeno parasitário aumentaram de forma expressiva a sensibilidade e a especificidade dos testes diagnósticos para LM. Usando a PCR convencional para detecção de *Leishmania sp.* em espécimes obtidos por biópsia, a sensibilidade variou

entre 95,7-97,1% com especificidade de 100% (BOGGILD et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2005). Mas a biópsia nasal para a obtenção de amostras de tecido é um procedimento invasivo que demanda a presença do otorrinolaringologista, o que limita a utilização prática em áreas endêmicas que estão geralmente longe dos grandes centros urbanos. Amostras de swab nasal têm sido avaliadas como ferramenta para diagnóstico da LM. O swab pode ser facilmente realizado em áreas endêmicas já que não exige expertise técnica ou anestesia para sua realização. É um procedimento não invasivo, indolor, sem risco de sangramento ou infecção secundária. Alternativamente, em amostras de swab nasal (Cervisoft®) de 28 pacientes com LM, Boggild et al. encontraram sensibilidade e especificidade de 95,7% e 90,0%, respectivamente, realizando PCR direcionado ao kDNA de *Leishmania sp.* (BOGGILD et al., 2011). O PCR de amostras de swab nasal pode ser uma alternativa à biópsia nasal para o diagnóstico de LM em estágios iniciais, em locais em que o otorrinolaringologista não esteja disponível.

IV.5. Leishmaniose Tegumentar – Tratamento

O tratamento medicamentoso para LT está disponível desde o início do século XX (GOTO; LINDOSO, 2010). O objetivo do tratamento da LCL é a cura clínica da lesão, com menor formação de cicatriz e eliminação do parasita com o objetivo de prevenir sua recidiva ou disseminação, p.ex. LM (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; GOTO; LINDOSO, 2010). São drogas recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Ministério da Saúde (MS) do Brasil para tratamento da LTA o antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), anfotericina B e pentamidina.

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) são as drogas de 1ª linha de acordo com o MS do Brasil (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2007). Apresentam mecanismo de ação desconhecido (GOTO; LINDOSO, 2010) mas são consideradas drogas leishmanicidas pois interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania sp.* ao inibirem a glicólise e oxidação de ácidos graxos, com diminuição na produção de ATP e GTP (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2007; GOTO; LINDOSO, 2010). Há 2 tipos, o antimoniato de N-metilglucamina, comercializado no Brasil como Glucantime® (Sanofi-Aventis), e o estibogluconato de sódio, não comercializado no Brasil. O Glucantime® está indicado para o tratamento de todas as formas clínicas de LTA. Entretanto, a posologia varia de acordo com a apresentação da doença. Para o tratamento de LCL o Ministério da Saúde do Brasil preconiza de 10 a 20mg Sb^{+5} /Kg/dia para adultos e crianças por 20 dias seguidos e para LM a dose recomendada é de 20mg Sb^{+5} /Kg/dia por 20 dias seguidos. A droga não deve ser administrada a gestantes e o uso deve

ser cauteloso em pacientes com idade superior a 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias e hepatopatias. O paciente deve ser reavaliado após 3 meses do término do tratamento, se não houver cicatrização completa pode-se repetir o esquema terapêutico por mais 30 dias. Se ainda assim não houver resposta deve-se partir para uma droga de segunda escolha.

A anfotericina B e a pentamidina são drogas de segunda escolha de acordo com Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2007). A anfotericina B (desoxicolato de anfotericina B) é uma droga leishmanicida já que atua nas formas promastigotas *in vitro* e amastigotas *in vivo*. É a primeira escolha em gestantes e a segunda quando não há resposta ao tratamento com antimonial pentavalente ou há impossibilidade de seu uso. Seu principal efeito colateral é a insuficiência renal aguda (AMATO et al., 2009), sendo contra-indicado seu uso em cardiopatas, hepatopatas e, principalmente, nefropatas. A dose recomendada pelo MS do Brasil é de 1mg/Kg/dia diariamente ou em dias alternados (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2007). A dose máxima diária recomendada é de 50mg e a total (tratamento completo) de 1-1,5g para LCL e de 2,5-3g para LM (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2007). Existe a possibilidade de uso da anfotericina B lipossomal que, apesar de alcançar concentrações plasmáticas mais elevadas, tem meia-vida mais curta que o desoxicolato de anfotericina B (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2007).

A pentamidina por sua vez mostrou resultados similares ao antimonial pentavalente, podendo ser opção para os casos em que há contra-indicação ou efeitos colaterais importantes que impossibilitem o uso

do antimoniato pentavalente (AMATO et al., 2009; TUON et al., 2008). Seu mecanismo de ação envolve sua interferência na síntese do DNA do parasita que leva à morte do mesmo (AMATO et al., 1996), sendo portanto também droga leishmanicida. A dose recomendada é de 4mg/Kg/dia administrada via intra-muscular a cada 2 dias, não ultrapassando a dose máxima total de 2g (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2007). Seus principais efeitos colaterais são hipo ou hiperglicemia (GOTO; LINDOSO, 2010), podendo também ocorrer hipotensão, alterações cardíacas e nefrotoxicidade.

V. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

V.1. Desenho de estudo

Este é um estudo de corte transversal no qual foram avaliados dois grupos, sendo um com LCL aguda e o outro com passado de tratamento completo para LCL. O primeiro deles foi de 157 pacientes com LCL ativa, sem lesão mucosa suspeita, antes de ser iniciado tratamento. O segundo grupo foi composto de 333 pacientes com história de LCL acompanhados em dois centros de referência para leishmaniose tegumentar, sendo uma na área endêmica do Vale do Jiquiriçá e outro em Corte de Pedra, ambos na Bahia, nordeste do Brasil. Todos os casos foram adequadamente tratados e apresentaram cura clínica de acordo com registro de dados de prontuário. Todos os pacientes foram submetidos a reavaliação clínica geral e otorrinolaringológica para coleta de swab nasal e identificação de lesão mucosa ativa suspeita. Durante esta avaliação foi preenchido ficha padrão (Anexo 1). Nesta ficha padrão foram preenchidos dados referentes ao episódio passado de LCL (dados clínicos e referentes ao tratamento) após consulta aos arquivos médicos de cada paciente. Os pacientes foram questionados ativamente sobre queixas nasais e registrado nesta ficha. Foi realizado exame físico otorrinolaringológico completo incluindo vídeoendoscopia nasal e laringoscopia quando indicado, sendo tudo registrado na ficha padrão.

Foram realizadas ainda teste de IDRM e, nos casos com suspeita de LM, biópsia da lesão. A amostra obtida por swab nasal foi submetida a extração do DNA da *Leishmania sp.* e realizado PCR convencional com o *primer* 150/152 e qPCR (PCR em tempo real) para todas as amostras. O material de biópsia foi encaminhado para histopatologia convencional.

V.2. Critérios de inclusão

Para o grupo com passado de tratamento para LCL (PLCL) foram incluídos aqueles com história de LCL diagnosticada pela equipe dos Centros de Referência em Leishmaniose de Corte de Pedra ou Vale do Jiquiriçá, tratada com ao menos 1 ciclo de droga leishmanicida (Glucantime®, anfotericina B ou pentamidina), e com cura clínica da lesão cutânea documentada em prontuário. Para o grupo com LCL ativa (LCLA) foram incluídos os pacientes atendidos no Centro de Referência em Leishmaniose do Vale do Jiquiriçá com LCL confirmada, antes de iniciar o tratamento e sem lesão mucosa suspeita.

V.3. Critérios de Não inclusão

Para o grupo de pacientes com história prévia de LCL não foram incluídos aqueles com lesão cutânea ativa no momento da avaliação otorrinolaringológica e prontuário médico sem registros do episódio passado de LCL, do tratamento ou da cura. Para aqueles com LCL ativa não foram incluídos aqueles que já haviam iniciado tratamento, que apresentavam lesão

mucosa suspeita ou tiveram outro diagnóstico para a úlcera cutânea (p.ex., carcinoma espinocelular, úlcera de estase, etc).

V.4. Diagnóstico

V.4.1. Leishmaniose cutânea localizada

O diagnóstico de LCL foi baseado, além do critério epidemiológico, na avaliação clínica, com presença de lesão cutânea característica (úlcera indolor, de formato arredondado, bem circunscrita, com bordas elevadas, endurecidas e eritematosas (GOTO; LINDOSO, 2010; JONES et al., 1987; LLANOS-CUENTAS et al., 1984a) e positividade no teste de IDRM e/ou histopatologia com imunohistoquímica.

V.4.2. Leishmaniose Mucosa

Os critérios utilizados para LM foram aspecto epidemiológico, com procedência de área endêmica e história de lesão cutânea de longa duração, além do aspecto clínico da lesão (aspecto granuloso, edema, erosão e formação de crostas) observado na rinoscopia anterior (no septo anterior e cabeça de corneto inferior) ou no exame de orofaringe e laringe (BOAVENTURA et al., 2006; MARSDEN et al., 1984; OLIVEIRA et al., 2005). A confirmação diagnóstica foi obtida por exame histopatológico com imunohistoquímica e PCR (BOGGILD et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2005; WEIRATHER et al., 2011). Foi realizado sequenciamento genético das

amostras de swab nasal desses pacientes para confirmação da presença de *L. braziliensis*.

V.5. Coleta do swab nasal

Para a coleta do swab nasal foi utilizado o Catch-All™ Sample Collection Swab (Epicentre®). O swab foi friccionado duas a três vezes em cada fossa nasal, no septo anterior e cabeça de corneto interior, após remoção de sujidades do vestíbulo nasal. Foram armazenados na sua própria embalagem e preservadas em gelo seco até o armazenamento em freezer a -80°C no Laboratório de Imunoparasitologia (LIP) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz – Ba (CPqGM – FIOCRUZ) para serem processadas.

V.6. Tratamento LCL

Foi considerado tratamento adequado quando usado de forma regular ao menos um ciclo de uma das drogas leishmanicidas: para o Glucantime®, a dose deveria ter sido entre 10-20mg Sb⁺⁵/Kg/dia para adultos e crianças, por 20 dias consecutivos; para a anfotericina B, a dose de 1mg/Kg/dia, diariamente ou em dias alternados, com dose máxima diária de 50mg e dose total de 1-1,5g; e para a pentamidina, a dose de 4mg/Kg/dia a cada 2 dias, não ultrapassando dose total de 2g.

V.7. Critérios de cura para LCL

A cura clínica foi estabelecida de acordo com o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2007). O paciente é reavaliado três meses após completado o tratamento pelos seguintes critérios: cicatrização com reepitelização completa da lesão cutânea, desaparecimento da endureção na base, regressão total da infiltração e eritema e ausência de novas lesões. Se houver evidência de cicatrização progressiva, mas ainda não completa, sem cumprir os critérios acima, a observação pode ser prolongada para até seis meses do término do tratamento.

V. 8. Cálculo amostral

A amostra de pacientes com passado de LCL foi calculada considerando a população e a taxa esperada para LM de 3% (BOAVENTURA et al., 2006; DE OLIVEIRA-NETO et al., 2000), com poder de 80% e $\alpha=5\%$. Para o grupo com LCL ativa, sem lesão mucosa, foi avaliada amostra de conveniência, com maior número possível de pacientes a fim de se observar positividade do swab nasal em indivíduos com lesão cutânea ativa e sem lesão mucosa clinicamente aparente.

V.9. Extração do DNA

A extração do DNA de *Leishmania sp.* dos swabs nasais foi realizada

utilizando o PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen®) e submetidos a teste de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) com *primers* específicos para o gene constitutivo da β -actina como controle de qualidade da reação.

V.10. PCR convencional - primer 150/152 (PCR 150/152)

A presença de DNA de *Leishmania sp.* nas amostras dos swabs de todos os pacientes incluídos foi avaliada por testes de PCR utilizando o *sense primer* 150 (3'GGGKAGGGGCGTTCTSCGAA5') e o *anti-sense primer* 152 (3'SSSWCTATWTTACACCAACCCC5') direcionados ao minicírculo kDNA, região conservada do gênero *Leishmania*. Foi seguido protocolo adaptado de Oliveira *et al.* (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Controles positivos e negativos foram incluídos em todos os testes de PCR realizados. Como controle negativo utilizou-se água ultrapura estéril e o positivo consistia em DNA extraído de promastigotas de uma amostra referência (*L. braziliensis* MHOM/BR/01/BA788).

V.11. PCR em tempo real (qPCR)

Os ensaios de qPCR foram baseados na amplificação do minicírculo do kDNA para detecção do DNA de *L. braziliensis* em amostras de swab nasal. Foi utilizado o conjunto de *primer* (Lbr kdna3 fw – TGC TAT AAA ATC GTA CCA CCC GAC A; Lbrkdna3 rv – GAA CGG GGT TTC TGT ATG CCA TTT, LbrMiniC3 prob - 6FAM/TTGCAGAACGCCCTACCCAGAGGC/TAMRA) previamente descrito

por Weirather *et al.* (WEIRATHER *et al.*, 2011). As reações foram conduzidas no StepOnePlus™ Real Time PCR System da Thermo Scientific (ABI) em volumes de mistura da reação de 10µl, como descrito previamente por Weirather *et al.* com mínimas modificações (WEIRATHER *et al.*, 2011). As reações foram realizadas com o TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems), com 375nM (cada) *forward* e *reverse primers* e 250nM *probe* (*label*, 5'FAM, e *quench*, 3'TAMRA). Os parâmetros de termociclagem consistiram em uma retenção a 95°C por 20 segundos seguido de 40 ciclos de temperatura de 95°C por 1 segundo e 60°C por 20 segundos. Os resultados foram analisados com software SDS 2.4 com uma linha basal automática e um limiar de ciclo manual (C_T) de 0.2 para todas as reações.

V.12. Clonagem e Sequenciamento

A fim de caracterizar os amplicons de PCR de 120bp gerados a partir das amostras dos pacientes, os produtos purificados foram clonados em um vetor pGEM-T(Promega) seguido pela transformação em células DH5 α *E. coli* quimicamente competentes. As células transformadas foram plaqueadas em meio de agar LB suplementadas com 100 µg/ml de ampicilina e quatro clones randomicamente selecionados de cada paciente foram usados para purificação do plasmídeo utilizando o kit miniprep de plasmídeo (Promega). Os plasmídios positivos foram confirmados por digestão de restrição *EcoRI* e o tamanho correto da inserção foi avaliada em agarose a 2% antes do sequenciamento. Clones positivos de cada amostra dos pacientes foram submetidos a sequenciamento com o vetor específico T7 e *primers* SP6.

As sequências obtidas foram submetidas à análise do nucleotídeo BLAS na base de dados NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). O alinhamento de sequências múltiplas foi realizado utilizando o *software* BIOEDIT (HALL, 1999).

V.13. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20.0.0 para MacOS. Os critérios de normalidade para as variáveis contínuas foram avaliados através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Aquelas com distribuição normal foram descritas como média e desvio padrão e aquelas com distribuição anormal como mediana e intervalo interquartil (IIQ). As variáveis categóricas foram descritas em valores absolutos e porcentagem. Foram realizados os testes exato de Fisher para as variáveis categóricas e de Mann-Whitney para as contínuas no grupo de pacientes com LCL ativa.

V.14. Aspectos éticos

O trabalho foi desenvolvido sob os critérios da Regulamentação da Bioética no Brasil, Resolução 196/96 de 10 de Outubro de 1996 e resoluções complementares do Conselho Nacional de Saúde, que determina as diretrizes a serem adotadas nas pesquisas que envolvem seres humanos, atendendo desta forma às exigências éticas e científicas fundamentais tendo aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo

Moniz (pareceres números 484908 e 477854– CEP/CPqGM/FIOCRUZ) (Anexos 2 e 3) e todos indivíduos ou familiares responsáveis pelos menores assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 4).

VI. ARTIGO 1

“Reduction of parasite persistence in patients treated for localized cutaneous leishmaniasis by *Leishmania braziliensis*”. PLOS Neglected Tropical Diseases [em processo para submissão], vide Normas de Publicação no Anexo 5.

Azevedo, ACA; Silva, MQA; Barreto, GC; Ribeiro, TC; Salgado, VR; Sharma, R; Correia, TC; de Noronha, ALL; Khouri, R; Barral, A; Boaventura, V.

Introduction

Among the wide spectrum of clinical manifestations of tegumentary leishmaniasis (TL), mucosal leishmaniasis (ML) is one of the most severe form because of the risk of facial deformity and potential lethality. Nasal involvement occurs in almost all cases causing a progressive mucosal injury that may remain undetectable for months to years before becoming symptomatic.

Leishmania sp. DNA can be present on nasal mucosa early at the active CL, when there is still no mucosal injury (FIGUEROA et al., 2009) with a decrease early after treatment (MARTÍNEZ-VALENCIA et al., 2017). However, it remains unknown if the risk of parasite persistence and mucosal injury can be reduced long term after proper treatment.

ML is recognized as a metastasis of a primary cutaneous leishmaniasis (CL) lesion appearing historically in 3 to 6% of patients 3-4 years after disease onset (MARSDEN et al., 1984). However, in the past years, a decrease in the frequency of ML cases have been reported in the endemic area of Bahia -

Northeast Brazil. Jirmanus *et al.* detected one-third decrease in the percentage of ML cases in a ten-year period (JIRMANUS *et al.*, 2012). The reasons for this phenomena are still unrecognized and may be related to both parasite and host factors.

It has been proposed that features related to CL lesion and therapy may modify the risk for ML. Among the presumable risk factors, incomplete and delayed treatment of CL have been potentially modified in endemic fields of Bahia/Brazil where several studies in TL have been performed. Here we assessed the frequency of parasite persistence in 157 individuals with active LCL before treatment and in 333 individuals five years after a complete therapy for LCL. The frequency of antigen persistence reduced from 7,6% in individuals with active LCL to 0,9% in individuals with past treated LCL. After a carefully ENT exam, mucosal injury restricted to the nasal cavity and compatible with ML was detected in two individuals (0,6%) that presented nasal bleeding (epistaxis), nasal obstruction and crusting. ML was confirmed by histopathological and PCR analysis and parasite sequencing revealed the presence of *Leishmania braziliensis*. We concluded that standard-of-care treatment for CL reduces the persistence of *Leishmania sp.* DNA on nasal mucosal and ML occurrence.

Materials and Methods

Study population

This is a cross-sectional study in which two groups were evaluated, one with acute LCL (ALCL) and the other with complete treatment for past LCL (PLCL). The first group had 155 patients with ALCL, with no suspicious

mucosal injury, before treatment was started. The second one was composed with 333 patients with a history of LCL followed up in two reference centers for tegumentary leishmaniasis (TL), one at the endemic area of Vale do Jiquiriçá and the other at Corte de Pedra county, both in Bahia, northeastern Brazil. All cases were properly treated and presented clinical cure according to registered data in medical records. The clinical and treatment data from the past LCL episodes were accessed from medical records. All patients were submitted to clinical and otorhinolaryngological (ENT) evaluation for nasal swab collection and identification of suspicious active mucosal injury and LST (*Leishmania* skin test). Patients were actively questioned about nasal symptoms. In patients with suspected ML biopsy was performed and forwarded to conventional histopathology, immunohistochemistry and PCR. Nasal swabs samples were submitted to DNA extraction and *Leishmania sp.* specific conventional PCR with 150/152 *primer* for all samples and qPCR (real time PCR) for PLCL samples.

Criteria for inclusion and non-inclusion

For the PLCL group, were included patients with a past history of LCL diagnosed by the team of the Reference Centers in Leishmaniasis of Vale do Jiquiriçá or Corte de Pedra, treated with at least one cycle of leishmanicidal drugs (meglumine antimoniate, amphotericin B or pentamidine) and documented clinical cure by the complete healing of the cutaneous ulcer. For the group with ALCL, were included patients attended at Reference Center in Leishmaniasis of Vale do Jiquiriçá with confirmed LCL, with no suspicious mucosal injury and before was initiated.

LCL diagnosis

LCL diagnosis was based on epidemiological criterion and clinical evaluation with presence of characteristic skin lesion (painless ulcer, rounded, well circumscribed, with raised, hardened and erythematous borders (GOTO; LINDOSO, 2010; JONES et al., 1987; LLANOS-CUENTAS et al., 1984) and positive LST and/or histopathology with immunohistochemistry.

ML diagnosis

The criteria used for ML diagnosis were the epidemiological aspect, from endemic area, and history of long-term skin lesions, as well as the appearance of the lesion (granular appearance, edema, erosion and crusting) observed in anterior rhinoscopy, at anterior septum and inferior turbinate head, or examination of oropharynx and larynx (BOAVENTURA et al., 2006; MARSDEN et al., 1984; OLIVEIRA et al., 2005). Diagnostic confirmation was obtained by histopathological examination with immunohistochemistry and PCR (BOGGILD et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2005). Nucleotide sequencing was performed of these nasal swab samples for confirmation of the presence of *L. braziliensis*.

Nasal swab collection

For nasal swab collection it was used Catch-All™ Sample Collection Swab (Epicentre®). The swab was rubbed two to three times in each nasal fossa, the anterior septum and inferior turbinate head, after removal of soils from the nasal vestibule. They were stored in their own packaging and

preserved in dry ice until freezer storage at -80 degrees in the Laboratory of Immunoparasitology (LIP) of the Gonçalo Moniz Research Center of the Oswaldo Cruz - Ba Foundation (CPqGM - FIOCRUZ) to be processed.

LCL treatment

Treatment was considered proper when at least one cycle of one of the following leishmanicidal drugs was used on the regular basis: for meglumine antimoniate, the dosage should have been between 10-20mg Sb⁺⁵/Kg/day for adults and children for 20 consecutive days; for anphotericin B a dose of 1mg/Kg/day daily or on alternate days, with maximum daily dose of 50mg and total treatment dose of 1-1,5g; and for pentamidine the dose of 4mg/Kg/day each 2 days, with maximum total dose of 2g.

Cure criteria for LCL

Clinical cure was established according to the American Tegumentary Leishmaniasis Surveillance Manual of the Brazilian Ministry of Health (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2007). The patient is reassessed three months after completing treatment by the following criteria: healing with complete re-epithelization of the cutaneous lesion, disappearance of the induration at the base, total regression of infiltration and erythema and the absence of new lesions. If there is evidence of progressive but not yet complete healing without meeting the above criteria, the observation can be extended to up to six months after the end of treatment.

Sample size calculation

The sample size of PLCL group was calculated considering the population and expected ratio of 3% for ML (BOAVENTURA et al., 2006; DE OLIVEIRA-NETO et al., 2000), with a power of 80% and $\alpha=5\%$. For the ALCL group, without mucosal injury, was evaluated patients attending the endemic area clinic, as a convenience sample, in order to observe nasal swab positivity in individuals with active cutaneous lesions and without clinically apparent mucosal injury.

DNA extraction

DNA extraction from the nasal swab samples was performed using the PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen®) and submitted to PCR assays with specific primers for the constitutive *β -actin* gene, as a quality control of the reaction.

Conventional PCR - primer 150/152 (PCR 150/152)

The presence of *Leishmania sp.* DNA in swabs samples was evaluated by PCR assays using sense primer 150 (3'GGGKAGGGGCGTTCTSCGAA5') and anti-sense primer 152 (3'SSSWCTATWTTACACCAACCCC5') directed to the conserved region of *Leishmania sp.* genus minicircle kDNA (kDNA) and following the protocol adapted from Oliveira *et al.* (OLIVEIRA et al., 2005). Negative and positive controls were included in all PCR assays performed. Negative controls consisted of sterile ultrapure water while positive controls comprised the DNA extracted from promastigotes of a reference sample (*L. braziliensis* MHOM/BR/01/BA788).

Real time PCR (qPCR)

Real time PCR assays were based on kDNA minicircle amplification for detection of *L. brasiliensis* DNA in nasal swab samples. It uses the primer set (Lbr kdna3 fw – TGC TAT AAA ATC GTA CCA CCC GAC A; Lbrkdna3 rv – GAA CGG GGT TTC TGT ATG CCA TTT, LbrMiniC3 prob – 6FAM/TTGCAGAACGCCCTACCCAGAGGC/TAMRA) described previously by Weirather *et al.* (WEIRATHER *et al.*, 2011). Reactions were conducted on a StepOnePlus™ Real Time_PCR System from Thermo Scientific (ABI) in 10µl reaction mixture volumes, as described previously by Weirather *et al.* with minor modifications (WEIRATHER *et al.*, 2011). Reactions were performed with TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems), 375nM (each) forward and reverse primers and 250nM probe (label, 5'FAM, and quench, 3'TAMRA). The thermocycling parameters consisted of a hold at 95°C for 20 seconds followed by 40 temperature cycles of 95°C for 1 second and 60°C for 20 seconds. The results were analyzed with SDS 2.4 software with an automatic baseline and a manual cycle threshold (C_T) of 0.2 for all reactions.

Cloning and sequencing

In order to further characterize the generated 120 bp PCR amplicons from the patients samples, purified products were cloned into a pGEM-T Easy vector (Promega) followed by transformation into chemically competent DH5 α *E. coli* cells. Transformed cells were plated on LB agar medium supplemented with 100 µg/ ml ampicillin and four randomly selected clones from each patient sample were used for the plasmid purification using the

plasmid miniprep kit (Promega). Positive plasmids were confirmed by *EcoRI* restriction digestion and the correct size of insert was evaluated on 2% agarose prior to sequencing. Positive clones from each patient sample were subjected to sequencing with the vector specific T7 and SP6 primers.

Obtained sequences were subjected to the nucleotide BLAST analysis at the NCBI database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). Multiple sequence alignment was performed by using the BIOEDIT software (HALL, 1999).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 20.0.0 for MacOS. The criteria for normality of continuous variables were assessed through Shapiro-Wilk test. The ones with a normal distribution were described as mean and standard deviation and the ones who didn't were described as median and interquartile range (IQR). Categorical variables were described in absolute values and percentages. Fisher exact test was performed for categorical variables and Mann-Whitney test for the continuous ones from ALCL group.

Ethics

The study protocol were approved by the Research Ethics Committee of the Gonçalo Moniz Research Center (protocols numbers 484908 and 477854 - CEP/CPqGM/FIOCRUZ). All individuals or family members responsible for under age minor signed the free and informed consent form.

Results

Description of groups with acute LCL and past treatment for LCL

A total of 157 patients were evaluated with acute LCL (ALCL) before treatment and 333 patients with proper treatment for past LCL episode (PLCL) (Tab 1). Patients from PLCL group had a history of LCL 5 years ago (IQR 3, 9.5), being 89,2% of cases for at least 2 years. In both groups, patients were mostly males with a median age of 36 (IQR 24, 50) (ALCL) and 31 (IQR 17, 45) (PLCL) years old. Patients on both groups had similar results in concern to cutaneous lesion size (median of 2cm), frequency of lesion above the belt line (36 and 40%), LST value (above 12mm) and number of meglumine antimoniate cycles for treatment (1 cycle) (Tab 1). Patients from ALCL group had symptoms for a median time of 2 months (IQR 1, 3) until diagnosis was made, while on PLCL group the median time was 1 month (IQR 1, 2), with a $p < 0,001$.

Table 1. Comparison of the clinical-epidemiological characteristics of the patients with acute cutaneous leishmaniasis and past cutaneous leishmaniasis.

	Acute LCL n=157	Past LCL n=333	p
Gender - male: n (%)	90 (57,3%)	178 (53,5%)	0,438
Age - Years: median (IQR)	36 (24, 50)	31 (17, 45)	0,003
Cutaneous injury			
- Size (cm): median (IQR)	2 (1, 2.5)	2 (1.2, 3)	0,083
- Location above beltline: n (%)	57 (36,3%)	126 (40,6%)	0,422
- Symptoms duration (months): median (IQR)	2 (1, 3)	1 (1, 2)	<0,001
LST (mm): median (IQR)	15 (9, 20)	12 (10, 16.8)	0,369
Treatment with MA – number of cycles: median (IQR)	1 (1, 2)	1 (1, 2)	0,419

LCL: Localized cutaneous leishmaniasis; IQR: Interquartile range; LST: leishmania skin test; MA: meglumine antimoniate.

Detection of parasite on nasal swab samples from acute LCL and past treatment for LCL

Despite all ALCL cases had healthy nasal mucosa on ENT evaluation, PCR test for *Leishmania sp.* was positive on 12 (7,6%) of the 157 patients with active cutaneous disease (Table 1). In PLCL group, three swab samples were excluded due to contamination on DNA extraction process. Of the remaining 330 patients we identified 3 (0,9%) with *Leishmania sp.* DNA present on nasal mucosa, with 2 of them with nasal injury compatible with ML. The difference observed between the 2 groups was statistically significant ($p=0,001$).

On qPCR analysis there was agreement with the results of conventional PCR in 96,2% (151/157) of nasal swab samples from patients of the ALCL group. On PLCL group all negative results on conventional PCR (primer 150/152) remained negative with qPCR and of the 3 positive samples on conventional PCR only the one from the patient without mucosal injury were negative on qPCR.

Description of patients with ALCL with and without parasite in the nasal mucosa

Of the 12 cases with *Leishmania sp.* DNA in the nasal mucosa, without mucosal injury, the majority were male (75%) and had cutaneous injury for about 2 months (IQR 1, 2.8), with a 2,8cm size (IQR 2, 3.8), located, in 50% of the cases, above the beltline (Table 2). There was a loss of follow-up with 1 (8,3%) of the 12 patients with detectable parasite in the nasal cavity. During treatment and follow-up, 5 of the 11 cases (45,5%) developed atypical forms

of CL: 4 had leishmaniasis recidiva cutis (LRC) and 1 had disseminated cutaneous leishmaniasis (DCL), who needed 3 cycles (IQR 2, 5) of meglumine antimoniate (Table 3). Of the 11 cases treated with meglumine antimoniate, 8 used more than 1 cycle (median of 2; IQR 1, 4). None of these 11 patients had nasal complaints or any suspected nasal injury.

Table 2. Acute LCL patients characteristics

	Nasal swab (150/152 PCR)		p
	Positive 12 (7,6%)	Negative 145 (92,3%)	
Gender - male: n (%)	9 (75%)	81 (55,9%)	0,238
Age - years: median (IQR)	47 (22, 54)	35 (24.5, 49)	0,677
Cutaneous injury			
- Number: median (IQR)	1,5 (1, 3.5)	1 (1, 2)	0,064
- Size (cm): median (IQR)	2,8 (2, 3.8)	1,7 (1, 2.5)	0,013
- Location above beltline: n (%)	6 (50%)	51 (35,2%)	0,355
- Symptoms duration (months): median (IQR)	2 (1, 2.8)	2 (1, 3)	0,948
LST (mm): median (IQR)	11,5 (4, 18)	15 (10, 20)	0,279
Treatment with MA – number of cycles: median (IQR)	2 (1, 4)	1 (1, 2)	0,030
Follow-up – Atypical forms (yes): n (%)	5 (41,7%)	20 (13,8%)	0,025
- Clinical cure/complete healing: n (%)	6 (50%)	85 (58,6%)	0,561
Loss of follow-up: n (%)	1 (8,3%)	22 (15,2%)	1

IIQ: interquartil range; LST: leishmania skin test; AM: meglumine antimoniate; CL: cutaneous leishmaniasis.

Table 3. Patients with acute LCL and positive PCR.

	Patients											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Gender	F	M	M	M	F	M	F	M	M	M	M	M
Age	61	23	48	29	22	28	59	6	51	57	51	11
Symptoms duration (months)	0,3	1	3	2	1	1	1	2	1	2	5	1
Lesion location	legs	face	legs	upper body	arms	face	legs	face	arms	upper body	legs	arms
Number of injuries	1	1	4	3	1	1	6	1	3	1	2	4
Size (cm)	0,3	1,5	7	11,5	4	1	4	3	1,7	2	7	3,2
Linfadenopathy	N	N	N	N	N	N	N	Y	N	N	Y	Y
LST (mm)	18	8	18	8	7	15	0	0	18	20	15	3
Secondary infection	N	N	Y	N	Y	N	Y	Y	N	N	Y	N
Treatment (AM cycles)	2	1	1	3	2	4	2	2	2	-	1	5
Follow-up	cure	cure	PH	LRC/PH	DCL/cure	LRC/cure	cure	LRC/PH	PH	FL	PH	LRC/cure

F: female; M: male; N: no; S: yes; Gluc= meglumine antimoniate; PH: parcial healing; LRC: leishmaniasis recidiva cutis; DCL: disseminated cutaneous leishmaniasis; FL: follow-up loss.

The 145 patients with ALCL that had a negative PCR test for *Leishmania sp.* in nasal swab samples (Table 2) were mainly male (55,9%). There was no statistically significant difference between the clinical characteristics of patients with or without detectable parasite in the nasal mucosa, except for size of the cutaneous injury, the median of number of cycles of meglumine antimoniate used until clinical cure and development of atypical forms of leishmaniasis ($p < 0,05$). Patients with positive PCR on nasal swab had the cutaneous injury with greater size, they needed more cycles of meglumine antimoniate to achieve clinical cure and evolved more frequently to recidiva cutis and disseminated cutaneous leishmaniasis.

Description of PLCL patients with detectable parasite on nasal mucosa

Among the three cases in the group of patients previously treated with positive PCR for *Leishmania sp.* at nasal swab sample, two presented with active mucosal injury of ML. Both of them were male, with age of 27 and 35 years old, with a history of cutaneous ulcer on inferior member treated and healed for 11 and 20 years ago, respectively (Table 4). Each of them had cutaneous ulcer of 2 and 10 cm. The median time interval between beginning of symptoms and LCL diagnosis was of 30 days for one of the patients. This information was not available for the other one. Both patients with ML diagnosis complained of nasal obstruction and epistaxis. One of them referred crusting and had purulent rhinorrhea on physical examination suggestive of bacterial infection. Both patients presented very initial mucosal injuries with a mild hyperemia and granulous appearance that were restricted to the anterior nasal septum and inferior turbinate, with no cartilage destruction (Fig 1).

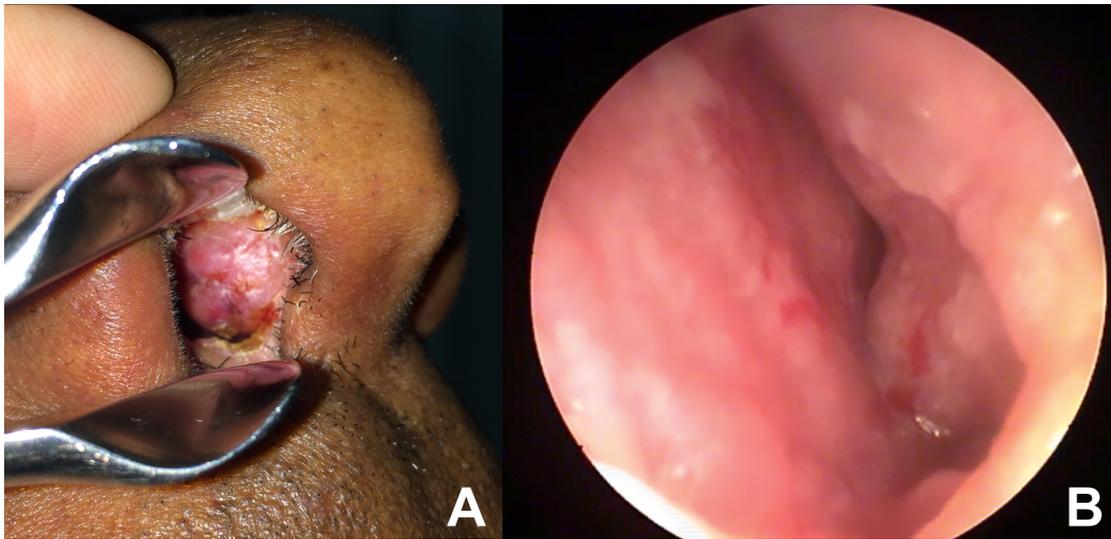
Histopathological examination revealed dense and diffuse inflammatory lymphohistiocyttoplasmic infiltrates and identification of the parasite in its amastigote form in one of the samples.

Table 4. Clinical and epidemiological characteristics of individuals with past treated LCL.

	ML		Healthy mucosa
	caso 1	caso 2	n=331
Gender: male, n (%)	male	male	176 (53,2%)
Nowadays age (years): mean \pm SD	34	27	39 \pm 19
Time since LCL past episode (years): median (IQR)	20	11	5 (3, 9)
Age – at time of LCL past episode (years): mean \pm SD	14	16	32 \pm 19
Location of previous cutaneous injury*			
Above beltline	no (legs)	no (legs)	126 (40,9%)
Size of cutaneous injury (cm)*: median (IQR)	10	2	2 (1,2, 3)
Days with symptoms until LCL diagnosis: median (IQR)	30	NI	30 (30, 60)
Lymphadenopathy*: present (%)	no	no	187 (64%)
LST- at past LCL episode: positive (%)	yes	NI	231 (96,2%)
Treatment – drug used			
Meglumine antimoniate	yes	yes	325 (98,2%)
Pentamidine	no	no	26 (7,9%)
Anfotericin	no	no	7 (2,1%)
Treatment - lenght (days): median (IQR)	20	20	30 (20, 40)
LST (mm) - nowadays*: median (IQR)	24	<4	14 (10, 20)
Nasal symptoms: present (%)	yes	yes	85 (25,7%)
Nasal swab PCR - 150/152**: positive (%)	yes	yes	1 (0,3%)
SD: standard deviation; IQR: interquartil range; LST: leishmania skin test.			
*Missing data: 23 for location of previous cutaneous injury, 78 for size of cutaneous injury, 39 of lymphadenopathy, 64 for days with symptoms until LCL diagnosis (including 1 patient with ML), 93 of LST at past LCL episode, 158 of nowadays LST from healthy mucosa group.			
**3 samples os patients with healthy mucosa were contaminated during DNA extraction.			

Fig 1. Initial mucosal injury on the two patients with ML.

(A) Anterior rhinoscopy of patient 1. (B) Nasal endoscopy of patient 2.



The nasal swab samples of these two patients with ML were submitted to genetic sequencing of *Leishmania sp.*. Comparative sequence analysis using the BLAST tools indicated highest similarity with *L. braziliensis* kinetoplast minicircle sequences, confirming the species as per expectation. Furthermore, a multiple sequence alignment was carried with our sequences along with earlier reported *L. braziliensis* minicircle sequence (Genebank ID-U19804.1) resulted in 98 and 94% identities for A4UF and B3UF (clones of the two patients with ML), respectively. Interestingly, we observed nucleotide polymorphism between the sequences of the two patients samples (Fig 2), that shared 94% homology with each other, suggesting possible parasite variations among patients of CL.

Fig 2. Multiple sequence alignment

U19804.1 *L. braziliensis* minicircle kDNA; A4UF patient 1 sample; B3UF patient 2 sample.



One patient from the PLCL presented a positive PCR for *Leishmania sp.* on nasal swab sample without active mucosal injury. This was a woman, with LCL 5 years ago (at age of 56 years) when presented a 21mm LST. The cutaneous ulcer was a single one, on leg, with 2,5cm diameter and lymphadenopathy. Were submitted to treatment with meglumine antimoniate after 40 days of symptoms start, reaching clinical cura after 1 cycle. At time of nasal swab collection and ENT examination she presented with complaints of chronic rhinopathy (itchy nose, sneezing and hyaline rhinorrhea) without any abnormality in the anterior rhinoscopy. A new LST was positive (31mm). Until now she remains under ENT follow-up for mucosal injury surveillance.

Description of PLCL patients without detectable parasite on nasal mucosa

Among individuals with healthy mucosa and past treated LCL, approximately half were males, with age of 39 ± 19 years and history of previous cutaneous ulcer of 2cm (IQR 1.2, 3) and below the belt line (59,1%) (Table 4). About 26% (85 of 331) of the patients with past treated LCL and clinically healthy mucosa presented with nasal symptoms, with complaints of

sneezing (19,9%), nasal obstruction/congestion (18,7%), itchy nose (18,1%) and hyaline rhinorrhea (16%). A few patients reported epistaxis and crusting, but there was no nasal injury suggestive of ML. Among patients with nasal symptoms, the majority had a diagnosis of chronic rhinopathy (86%). Nasal mucosa mostly had a normal color (69,5%), some were pale (22,1%) and a very few had a hyperemia (8,5%). Some patients presented a deviated septum (13,3%) and hypertrophy of inferior turbinates (12,4%). After ENT evaluation most of these patients with healthy mucosa were asymptomatic with normal physical examination (75,1%).

Discussion

In this paper we found a higher positivity (7,6%) on PCR test from nasal swab samples among individuals with acute LCL, without mucosal injury, when compared to the group with past treated LCL (0,9%), most of them reassessed after, at least, 2 years from treatment and clinical cure. In a study from Colombia, it was found a positive PCR for *Leishmania sp.* in 45 to 63% of swab samples from the mucosa of patients with acute LCL, without active mucosal lesion (FIGUEROA et al., 2009; MARTÍNEZ-VALENCIA et al., 2017). This difference between our study from Brazil and the one from Colombia may be due to the different primers used, although they are all directed to the conserved region of *Leishmania* genus minicircle kDNA, and/or to the *Leishmania* species found in each paper. It is known that *L. panamensis* causes more frequently mucosal lesion concomitantly with the cutaneous ulcer (OSORIO; CASTILLO; OCHOA, 1998) and this was the species most identified in the two studies cited, in 73 (FIGUEROA et al.,

2009) and 93% (MARTÍNEZ-VALENCIA et al., 2017), being able to justify a greater positivity of nasal swab still without mucosal lesion in patients with acute LCL. Interestingly, the percentage of cases with detectable parasite in the nasal mucosa we found before treatment for LCL is similar to the 6% frequency historically reported by Marsden *et al.* for ML among the cases that had LCL (MARSDEN et al., 1984). It is possible that the migration of the parasite to the nasal mucosa should occur early during the LCL episode.

The reduction in the frequency of parasites in swab samples was also described by Valencia *et al.*, that observed reduction on PCR positivity of nasal and palatine tonsils swab samples from 45 to 3,3% after 13 weeks of treatment completion (MARTÍNEZ-VALENCIA et al., 2017). This demonstrates that a complete treatment with leishmanicidal drug may significantly reduce the parasite persistence in the nasal mucosa, even years after this treatment. With proper treatment of the cutaneous injury, only a few individuals will persist with *Leishmania sp.* DNA on mucosal site and may be at risk for ML development.

Leishmania sp. seems to migrate to the mucosal site early during acute cutaneous infection in a frequency that may vary according to the species of *Leishmania* involved (FIGUEROA et al., 2009; MARTÍNEZ-VALENCIA et al., 2017). Some patients will develop an acute lesion that may progress slowly until becomes symptomatic (BOAVENTURA et al., 2006). Others maintain asymptomatic infection for months to years until an anti-leishmania inflammatory response is triggered (perhaps by local trauma or other concomitant infection) leading to the appearance of a mucosal active lesion. If treatment with the leishmanicidal drug is established early during acute LCL,

the parasite is destroyed in most cases, reducing the occurrence of *Leishmania* DNA in the nasal mucosa of these patients.

Of the 12 patients that we identified with *Leishmania* DNA in the nasal mucosa through PCR 150/152 during acute LCL episode, with clinically healthy mucosa, 8 needed more than 1 cycle of meglumine antimoniate, with a median of 2 cycles, 41,7% evolved with atypical presentations such as *recidiva cutis* and disseminated cutaneous leishmaniasis and presented with a larger cutaneous injury (median size of 2,8cm), with a statistically significant difference when compared to the group that had a negative PCR. This result may suggest some factor related to the parasite or host leading to greater metastization for the mucosa and/or resistance to treatment and/or host inflammatory response.

Among the 12 nasal swab samples positive on conventional PCR, from individuals with ALCL, 58,3% (7/12) were confirmed on qPCR; and 1 of the negative samples on conventional PCR were positive on qPCR. On the PLCL group, of the 3 samples with positive conventional PCR, 2 were from patients with late ML. When repeated the PCR on the PLCL group using qPCR technique, all those that were negative kept negative with qPCR. This confirms the result found once qPCR is a technique with greater sensibility, capable of detecting low levels of parasite (WEIRATHER et al., 2011). It is unknown what factors explain the persistence or elimination of the parasite and the clinical and epidemiological impact of the persistence of the *Leishmania sp.* DNA on the mucosa (MARTÍNEZ-VALENCIA et al., 2017).

Historically it has been described that at around 3 to 6% of the patients with LCL will present a concomitant or late ML (BARRAL et al., 1991;

BOAVENTURA et al., 2006; JIRMANUS et al., 2012; JONES et al., 1987; MARSDEN, 1986). There have been considered some risk factors for ML such as the size of the cutaneous injury greater than 4cm, injuries above the beltline, disease evolution of more than 4 months and inappropriate treatment of the cutaneous injury (BLUM et al., 2012; JONES et al., 1987; LLANOS-CUENTAS et al., 1984; MACHADO-COELHO et al., 2005; MARSDEN et al., 1984). Among them, the inadequate treatment of LCL, with a not recommended drug or for a shorter time or lower dose than recommended, may be potentially altered.

After clinical and otorhinolaryngological reevaluation of patients with past history of cutaneous ulcer caused by *Leishmania sp.* that were treated and healed, we found a frequency of 0,6% (2 of 333) of patients with initial mucosal lesions due to leishmaniasis. Oliveira-Neto *et al.* evaluating clinical records of patients seen for over one decade at Evandro Chagas Hospital (RJ/Brazil), found that among 69 cases of ML, 88% did not receive any kind of treatment for LCL (DE OLIVEIRA-NETO et al., 2000). While among the 658 individuals treated for LCL just 3 cases (0,4%) developed late ML. Taken together, these data suggest that in sites where there is active surveillance of TL, the historical frequency of ML cases among LCL (3-6%) may be reduced by appropriate treatment of cutaneous disease. Jirmanus *et al.* demonstrated that in the endemic area of Corte de Pedra - Bahia, northeastern Brazil, there was a reduction of 9,1% to 3,3% in the number of ML cases over 10 years (JIRMANUS et al., 2012). It is possible to attribute this reduction to a greater accessibility to the health service and, thereafter, the early treatment of cutaneous disease.

The time interval between past LCL episode and its treatment and mucosal disease establishment was 20 e 11 years for each of ML patients on our series. Marsden *et al.* found a mean of 3 to 4 years between LCL and ML episodes, with 46% of ML cases occurring before 2 years from past LCL episode (MARS DEN et al., 1984). The individuals we evaluated with clinically healthy mucosa presented a median of 5 years (IQR 3, 9) between past LCL episode and ENT evaluation. In 89,1% (295/331) this period of at least 2 years and 59,5% (197/331) for at least 5 years, demonstrating that our patients were evaluated after sufficient time to detect the occurrence of eventual mucosal injury. Regarding the other risk factors, only one of the patients found with ML had the past cutaneous lesion greater than 4cm (one had it of 10cm and the other 2cm), both had it on the legs and a disease duration of 30 days.

The 2 patients diagnosed with ML had very initial lesions, restricted to the anterior nasal septum and inferior turbinate head, with no facial deformities, similar to what was described by Boaventura *et al.* (BOAVENTURA et al., 2006). The nose is the most affected mucosal area in ML (BOAVENTURA et al., 2006; MARS DEN et al., 1984), 100% affected when multiple lesions are present and 92% of single lesion cases (MARS DEN et al., 1984). They complained both of nasal obstruction and epistaxis (nasal bleeding), and only 1 referred crusting and purulent rhinorrhea. Epistaxis, persistent mucosal secretion, nasal obstruction and crusting can all be early symptoms of ML (MARS DEN et al., 1984). Nasal obstruction can be a very unspecific symptom as it can be common to a range of nasal diseases as rhinitis, rhinosinusitis, deviated septum, inferior turbinate hypertrophy, nasal

tumors and others. It was the second more frequent nasal complaint among our patients. Epistaxis was a less frequently reported symptom in patients with a healthy mucosa (8 of 331). Its presence draws attention to the possibility of granulomatous disease, especially when associated with crusting. Although only 1 of the 2 patients with ML presented with crusting it is a not so common symptom in patients without granulomatous disease (only 7 out of 331 reported it). The presence of symptoms as epistaxis and crusting in nasal fossae, although alone do not predict the diagnosis for ML, they should draw attention of the health professional at the endemic area for leishmaniasis to the possibility of ML, and conduct to the assessment to elucidate the diagnosis. LST was considerably higher in the patient with ML (24mm) when compared to individuals with past LCL and clinically healthy mucosa that had nasal symptoms ($14,5 \pm 5,9$ mm). A positive LST in patients with past LCL is not a marker for late ML but the size of the induration can be an indicator of ML.

In this present study, the two patients found with suspicious mucosal lesions, that were confirmed as ML after histopathology, with parasite detection in one of the samples, and PCR of biopsy specimen, had positive PCR 150/152 and qPCR of nasal swab samples, result confirmed by the genetic sequencing that confirmed *L. braziliensis* DNA in the samples. Nasal swab samples have been tested to help ML diagnosis (BOGGILD et al., 2011; GOMES et al., 2014). Boggild *et al.* found a 95,7% of sensitivity for nasal swab samples for diagnosis in patients with suspected ML (BOGGILD et al., 2011). Considerably higher than the 21,7% of sensitivity for biopsy with

histopathology and equal to gold standard PCR of biopsy specimen (BOGGILD et al., 2011).

Nasal swab is a very promising diagnostic tool for ML in suspected cases with nasal symptoms and nonspecific physical examination findings, specially in endemic areas where there is a difficulty access to a otorhinolaryngologist specialist evaluation. Once referred for laboratory analysis, it would serve as a screening method for the selection of patients to be referred for ENT evaluation.

We conclude then that there is a tropism of *Leishmania* to the nasal mucosa on acute LCL, mainly among individuals that evolved to atypical presentations of LCL, that were resistant to treatment and that presented with larger cutaneous injury. And that after adequate treatment of LCL it was possible to identify *Leishmania* DNA on nasal mucosa only at the cases with active ML.

VII. RESULTADOS GERAIS

VII.1. Caracterização dos grupos de LCL aguda e de passado de tratamento para LCL

Ao todo foram avaliados 157 pacientes com diagnóstico de LCL aguda (LCLA) não tratados e 333 pacientes com tratamento adequado para LCL no passado (LCLP) (Tabela 1). Os indivíduos de grupo LCLP tinham histórico de LCL há 5 anos (IIQ 3, 9.5), sendo 89,2% dos casos há pelo menos 2 anos. Todos os casos foram tratados com droga leishmanicida, com cura clínica registrada em prontuário.

Tabela 1. Comparação das características clínico-epidemiológicas e swab nasal dos pacientes com leishmaniose cutânea aguda e passado de leishmaniose cutânea.

	LCL aguda n=157	Passado de LCL n=333	p
Sexo - masculino: n (%)	90 (57,3%)	178 (53,5%)	0,438
Idade - anos: mediana (IIQ)	36 (24, 50)	31 (17, 45)	0,003
Lesão cutânea			
- Tamanho (cm): mediana (IIQ)	2 (1, 2.5)	2 (1.2, 3)	0,083
- Localização acima cintura pélvica: n (%)	57 (36,3%)	126 (40,6%)	0,422
- Duração sintomas (meses): mediana (IIQ)	2 (1, 3)	1 (1, 2)	<0,001
IDRM (mm): mediana (IIQ)	15 (9, 20)	12 (10, 16.8)	0,369
Tratamento com AM - número de ciclos: mediana (IIQ)	1 (1, 2)	1 (1, 2)	0,419
PCR 150/152 swab nasal - positivo: n (%)	12 (7,6%)	3 (0,9%)	<0,001

LCL: Leishmaniose cutânea localizada; IIQ: intervalo interquartil; AM: antimoniatato de N-metilglucamina.

Nos dois grupos, os pacientes eram em sua maioria do sexo masculino, com idade mediana de 36 (IIQ 24, 50) (LCLA) e 31 (IIQ 17, 45) (LCLP) anos. No grupo com LCLA os sintomas tiveram duração mediana de 2 meses (IIQ 1, 3), enquanto que no com LCLP foi de 1 mês (IIQ 1, 2), com

$p < 0,001$. Os pacientes com LCLA e LCLP apresentaram resultados semelhantes quanto ao tamanho da lesão cutânea (mediana de 2cm), frequência de lesão acima da cintura (36 e 40%), valor da IDR (acima de 12mm) e número de ciclos de tratamento com Glucantime® (1 ciclo) (Tabela 1).

VII.2. Detecção de parasita em amostra de swab nasal de LCL aguda e de passado de tratamento para LCL

Apesar de todos os casos de LCLA apresentarem mucosa clinicamente saudável ao exame físico, o teste de PCR convencional para *Leishmania sp.* foi positivo em 12 (7,6%) dos 157 indivíduos com doença cutânea ativa (Tabela 1). No grupo LCLP, três amostras de swab nasal foram excluídas porque houve contaminação durante o processo de extração de DNA para o teste do PCR. Nas 330 restantes foram identificados três casos (0,9%) com DNA de *Leishmania* detectável na mucosa nasal, sendo que dois apresentavam lesão mucosa compatível com LM. A diferença observada no resultado do PCR do swab nasal entre os grupos LCLA e LCLP foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

No qPCR houve concordância com os resultados do PCR convencional em 96,2% (151/157) das amostras dos pacientes do grupo LCLA. No grupo LCLP todos os testes negativos no PCR convencional (primer 150/152) mantiveram-se negativos com o qPCR e dos 3 positivos no PCR convencional apenas o da paciente sem lesão mucosa, foi negativo no qPCR.

VII.3. Caracterização dos pacientes com LCLA com e sem parasita detectável na mucosa nasal

Dos 12 casos que apresentaram DNA de *Leishmania sp.* na mucosa nasal sem lesão, a maioria era do sexo masculino (75%) e apresentavam lesão cutânea há cerca de 2 meses (IIQ 1, 2.8), medindo 2,8cm (IIQ 2, 3.8), localizada, em 50% dos casos, acima da cintura pélvica (Tabela 2). Houve perda de seguimento de um (8,3%) dos 12 pacientes com parasita detectável na cavidade nasal. Durante o acompanhamento e tratamento, 5 dos 11 casos (45,5%) desenvolveram formas atípicas da leishmaniose cutânea: 4 apresentaram LRC e um LCD, necessitando de 3 (IIQ 2, 5) ciclos de tratamento com Glucantime® (Tabela 3). Dos 11 casos tratados com Glucantime®, 8 fizeram uso de mais de um ciclo da droga (mediana de 2; IIQ 1, 4). Nenhum desses 11 pacientes apresentavam queixas nasais.

Tabela 2. Características dos pacientes com LCL aguda.

	Swab nasal (PCR 150/152)		p
	Positivo 12 (7,6%)	Negativo 145 (92,3%)	
Sexo - masculino: n (%)	9 (75%)	81 (55,9%)	0,238
Idade - anos: mediana (IIQ)	47 (22, 54)	35 (24.5, 49)	0,677
Lesão cutânea			
- Número: mediana (IIQ)	1,5 (1, 3.5)	1 (1, 2)	0,064
- Tamanho (cm): mediana (IIQ)	2,8 (2, 3.8)	1,7 (1, 2.5)	0,013*
- Localização acima cintura pélvica: n (%)	6 (50%)	51 (35,2%)	0,355
- Duração sintomas (meses): mediana (IIQ)	2 (1, 2.8)	2 (1, 3)	0,948
IDRM (mm): mediana (IIQ)	11,5 (4, 18)	15 (10, 20)	0,279
Tratamento com AM - número de ciclos: mediana (IIQ)	2 (1, 4)	1 (1, 2)	0,030*
Evolução – Formas atípicas (sim): n (%)	5 (41,7%)	20 (13,8%)	0,025*
– Cura clínica/cicatrização completa: n (%)	6 (50%)	85 (58,6%)	0,561
Perda de seguimento: n (%)	1 (8,3%)	22 (15,2%)	1

LCL: Leishmaniose cutânea localizada; DP: desvio padrão; IIQ: intervalo interquartil; AM: antimonio de N-metilglucamina; LC: leishmaniose cutânea

Tabela 3. Pacientes com LCL aguda e PCR swab nasal positivo

	Pacientes											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sexo	F	M	M	M	F	M	F	M	M	M	M	M
Idade	61	23	48	29	22	28	59	6	51	57	51	11
Tempo sintomas (meses)	0,3	1	3	2	1	1	1	2	1	2	5	1
Localização lesão	MMII	face	MMII	tronco	MMSS	face	MMII	face	MMSS	tronco	MMII	MMS:
Número lesões	1	1	4	3	1	1	6	1	3	1	2	4
Tamanho (cm)	0,3	1,5	7	11,5	4	1	4	3	1,7	2	7	3,2
Linfonodo	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	S	S
IDRM (mm)	18	8	18	8	7	15	0	0	18	20	15	3
Infecção secundária	N	N	S	N	S	N	S	S	N	N	S	N
Tratamento (ciclos de Gluc)	2	1	1	3	2	4	2	2	2	-	1	5
Evolução	cura	cura	Cparcial	Cparcial	RC e LCD e cura	RC e cura	cura	RC e Cparcial	C parcial	PS	Cparcial	RC e cura
PCR 150/152	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
qPCR	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+

F: feminino; M: masculino; N: não; S: sim; Gluc= antimoníato de N-metilglucamina; C: cicatrização; RC: recidiva cutis; LCD: Leishmaniose Cutânea Disseminada; PS: perda seguimento.

Os 145 pacientes com LCLA que apresentaram teste PCR negativo para *Leishmania sp.* na amostra do swab nasal (Tabela 2) eram na maioria do sexo masculino (55,9%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as características clínicas dos pacientes com ou sem parasita detectável na mucosa nasal, exceto pelo tamanho mediano da maior lesão cutânea, com úlceras de maior tamanho nos indivíduos que tiveram o PCR positivo, pela mediana de ciclos de Glucantime® usados para atingir a cura clínica, e que os indivíduos com DNA de *Leishmania* na mucosa nasal evoluíram com maior frequência para formas atípicas, RC e LCD ($p < 0,05$).

VII.4. Caracterização dos pacientes com LCLP com parasita detectável na mucosa nasal

Entre os três casos do grupo de pacientes previamente tratados com PCR positivo para *Leishmania sp.* na amostra de swab nasal, dois apresentavam lesão mucosa nasal ativa de LM. Ambos eram do sexo masculino, com idade de 27 e 35 anos, com histórico de úlcera cutânea em

membro inferior tratada e curada há cerca de 11 e 20 anos, respectivamente (Tabela 4). Os dois pacientes com LM tiveram úlceras cutâneas de 2 e 10cm cada um. O tempo mediano de intervalo entre o início dos sintomas e diagnóstico do episódio prévio de LCL foi de 30 dias para um dos pacientes. Porém essa informação não foi encontrada para o outro caso de LM. Os dois pacientes apresentavam sintomas nasais de obstrução e epistaxe. Um deles referia formação de crostas e apresentava secreção purulenta sugestiva de infecção bacteriana secundária. Nos dois casos as lesões eram iniciais, com hiperemia leve e lesão de aspecto granuloso restritas ao septo nasal anterior e cabeça de corneto inferior, sem destruição de cartilagem (Figura 1). O exame histológico revelou denso e difuso infiltrado inflamatório linfo-histio-plasmocitário e identificação do parasita na sua forma amastigota em uma das amostras.

Tabela 4. Características clínicas e epidemiológicas dos indivíduos com passado de LCL.

	LM		Mucosa sem lesão
	caso 1	caso 2	n=331
Sexo: masculino, n (%)	masculino	masculino	176 (53,2%)
Idade atual (anos): média ± DP	34	27	39 ± 19
Tempo desde episódio LCL (anos): mediana (IIQ)	20	11	5 (3, 9)
Idade - no episódio de LCL (anos): média ± DP	14	16	32 ± 19
Localização da lesão cutânea prévia*			
Acima da cintura pélvica	não (MMII)	não (MMII)	126 (40,9%)
Tamanho lesão cutânea (cm)*: mediana (IIQ)	10	2	2 (1,2, 3)
Dias com sintomas até diagnóstico LCL: mediana (IIQ)	30	NI	30 (30, 60)
Linfadenopatia*: presente (%)	não	não	187 (64%)
IDRM - no episódio passado de LCL: positivo (%)	sim	NI	231 (96,2%)
Tratamento - droga utilizada			
Glucantime®	sim	sim	325 (98,2%)
Pentamidina	não	não	26 (7,9%)
Anfotericina	não	não	7 (2,1%)
Tratamento - duração (dias): mediana (IIQ)	20	20	30 (20, 40)
IDRM (mm) - atual*: mediana (IIQ)	24	<4	14 (10, 20)
Sintomas nasais: presente (%)	sim	sim	85 (25,7%)
PCR swab nasal - 150/152**: positivo (%)	sim	sim	1 (0,3%)

DP: desvio padrão; IIQ: intervalo interquartil; MMII: membros inferiores; IDRM: Intradermorreação de Montenegro.

*Dados faltando: 23 para localização da lesão cutânea prévia, 78 para tamanho da lesão cutânea, 39 de linfadenopatia, 64 de duração da doença (incluindo 1 dos pacientes com LM), 93 da IDRM do episódio passado de LCL, 158 da IDRM atual no grupo com a mucosa sadia.

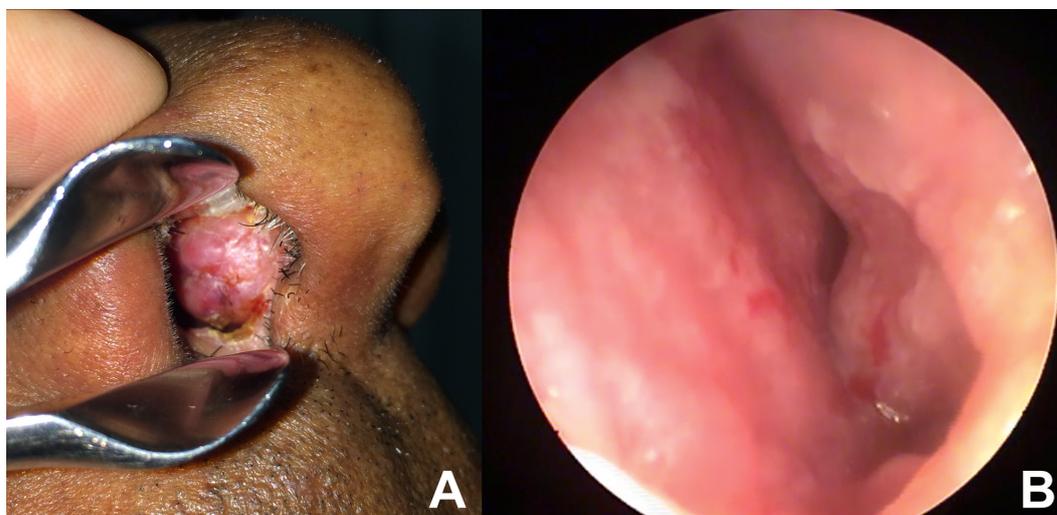


Figura 1. Lesão mucosa inicial dos 2 pacientes com LM.
A, Rinoscopia anterior do paciente 1; B, Endoscopia nasal do paciente 2.

As amostras de swab nasal dos dois casos de LM foram submetidas a sequenciamento genético da *Leishmania sp.* A análise comparativa de sequências utilizando ferramentas BLAST indicou alta similaridade com sequências do minicírculo do cinetoplasto de *L. braziliensis*. Além disso, um alinhamento de seqüência múltipla foi realizado com nossas sequências juntamente com a seqüência minicírculo de *L. braziliensis* relatada anteriormente (Genbank ID- U19804.1) e resultou em 98 e 94% de identidade para A4UF e B3UF (clones dos dois pacientes com LM), respectivamente. Curiosamente observamos polimorfismo de nucleotídeo existente entre as sequências dos dois pacientes (Figura 2), compartilhando 94% de homologia entre si, o que sugere possíveis variações genéticas do parasita entre os pacientes com LC.

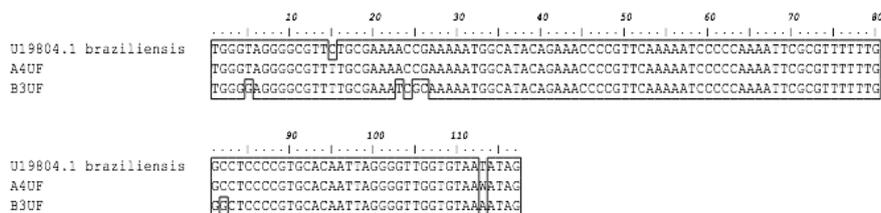


Figura 2. Alinhamento de seqüências múltiplas - U19804.1 *L. braziliensis*-minicirculo do kDNA; A4UF amostra paciente 1; B3UF amostra paciente 2.

Um paciente do grupo LCLP, sem lesão mucosa ativa, apresentou PCR convencional positivo para *Leishmania sp.* na amostra de swab nasal, no entanto, esse resultado não confirmado na qPCR. Trata-se de uma mulher, com episódio de LCL há 5 anos (aos 56 anos de idade) quando apresentou IDRM de 21mm. A lesão cutânea era única, na perna, com diâmetro de 2,5cm e presença de linfonomegalia. Realizou tratamento com Glucantime® após 40 dias do início dos sintomas, alcançando cura clínica após um ciclo da medicação. No momento da coleta do swab nasal apresentava queixas de rinopatia crônica (prurido nasal, esternutos, rinorréia hialina) sem alterações na rinoscopia anterior. Novo exame de IDRM foi positivo (31mm). No momento, permanece em acompanhamento otorrinolaringológico para vigilância de eventual lesão mucosa.

VII.5. Caracterização dos pacientes com LCLP sem parasita detectável na mucosa nasal

Entre os indivíduos com mucosa sadia e passado de LCL tratada, aproximadamente metade era do sexo masculino, com idade de 39 ± 19 anos e história de úlcera cutânea prévia de 2cm (IIQ 1.2, 3) e abaixo da cintura pélvica (59,1%) (Tabela 4). Cerca de 26% (85 de 331) dos pacientes com

passado de LCL tratada e mucosa clinicamente saudável apresentavam sintomas nasais, com queixas de esternutos (19,9%), obstrução/congestão nasal (18,7%), prurido nasal (18,1%) e rinorréia hialina (16%) (Figura 3). Raros pacientes referiram epistaxe e crostas, sendo que não foi identificada lesão mucosa sugestiva de LM. Entre os pacientes com sintomas nasais a maioria teve diagnóstico de rinosinusopatia crônica (86%). Em sua maioria a mucosa nasal apresentava-se normocorada (69,9%), algumas eram pálidas (22,1%) e poucas com hiperemia (8,5%). Alguns pacientes apresentavam desvio septal (13,3%) e hipertrofia de cornetos inferiores (12,4%). A maioria destes pacientes com mucosa clinicamente saudável era assintomática e com exame físico otorrinolaringológico normal (75,1%).

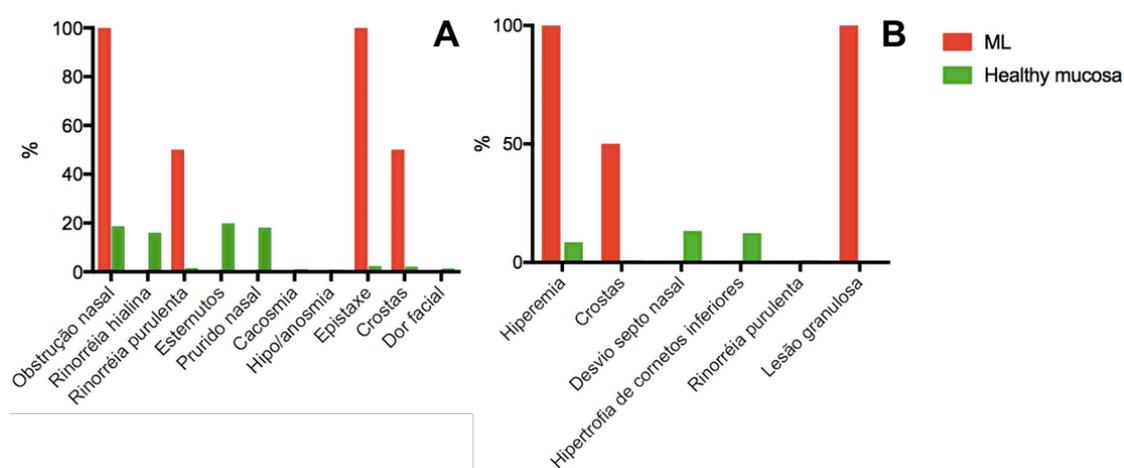


Figura 3. Avaliação otorrinolaringológica dos pacientes com passado de LCL.
A, Sintomas nasais; **B,** Achados de exame físico.

VIII. DISCUSSÃO

Neste trabalho, encontramos maior positividade (7,6%) no teste de PCR de amostras de swab nasal de indivíduos com LCL aguda, sem lesão mucosa, comparado ao grupo com passado de LCL (0,9%), reavaliados na maioria dos casos após, pelo menos, 2 anos do tratamento e cura clínica. Em estudos realizados na Colômbia, foi encontrado PCR positivo para *Leishmania sp.* em 45 a 63% das amostras de swab de mucosa de pacientes com LCL aguda, sem lesão mucosa ativa (FIGUEROA et al., 2009; MARTÍNEZ-VALENCIA et al., 2017). Essa diferença de frequência entre o nosso estudo realizado no Brasil e o da Colômbia pode ser devida aos diferentes primers utilizados, apesar de ambos serem direcionados ao kDNA de *Leishmania sp.*, ou a diferenças nas espécies presentes em cada trabalho. A *L. panamensis* causa mais frequentemente lesão mucosa concomitante com úlcera cutânea (OSORIO; CASTILLO; OCHOA, 1998) e esta foi a espécie mais identificada nos dois estudos citados, em 73 (FIGUEROA et al., 2009) e 93% (MARTÍNEZ-VALENCIA et al., 2017), podendo justificar uma maior positividade do swab nasal ainda sem lesão mucosa em pacientes com LCL aguda. Interessante observar que o percentual de casos com parasita detectável na mucosa nasal que encontramos antes do tratamento para LCL é semelhante a frequência de 6% historicamente reportada por Marsden et al. para a LM entre os casos que desenvolvem LCL (MARSDEN et al., 1984). É possível que a migração do parasita para a mucosa nasal deve acontecer precocemente durante o episódio de LCL.

A redução na frequência de parasitas nas amostras de swab também foi descrita por Valencia *et al.*, que observaram redução da positividade no PCR em amostras de swab nasal e de tonsilas palatinas de 45 para 3,3% após 13 semanas do término do tratamento (MARTÍNEZ-VALENCIA *et al.*, 2017). Isso demonstra que o tratamento completo com droga leishmanicida pode reduzir significativamente a persistência do parasita na mucosa nasal, mesmo anos após esse tratamento. Com o tratamento adequado da lesão cutânea, apenas alguns indivíduos irão persistir com o antígeno do parasita no sítio mucoso e podem estar sob risco para o desenvolvimento de LM.

A *Leishmania sp.* parece migrar precocemente para o tecido mucoso numa infecção cutânea aguda em frequência que pode variar de acordo com a espécie de *Leishmania sp.* envolvida (FIGUEROA *et al.*, 2009; MARTÍNEZ-VALENCIA *et al.*, 2017). Alguns pacientes desenvolvem lesão aguda que pode progredir de forma lenta até tornar-se sintomático (BOAVENTURA *et al.*, 2006). Outros mantêm infecção assintomática por meses a anos até que uma resposta inflamatória anti-leishmania é desencadeada (talvez por trauma local ou outra infecção concomitante) culminando com a apresentação de lesão mucosa ativa. Se o tratamento com droga leishmanicida é iniciado cedo durante episódio de LCL aguda, o parasita é destruído na maioria dos casos, diminuindo a ocorrência de *Leishmania sp.* na mucosa nasal desses pacientes.

Dos 12 pacientes que identificamos com presença de *Leishmania sp.* na mucosa nasal através do PCR 150/152 durante episódio agudo de LCL, com mucosa nasal clinicamente saudável, 8 precisaram de mais de 1 ciclo de Glucantime®, 41,7% evoluíram com formas atípicas (RC e LCD) e

apresentavam lesão cutânea de maior tamanho (mediana de 2,8cm), com diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo que teve o PCR negativo. Esse resultado pode sugerir algum fator relacionado ao parasita e/ou hospedeiro levando a maior metastatização para mucosa e/ou resistência ao tratamento e/ou resposta inflamatória do hospedeiro.

Das 12 amostras de swab nasal positivas no PCR convencional, de indivíduos com LCLA, 58,3% (7/12) foram confirmadas com o qPCR; e 1 das amostras negativas no PCR convencional mostrou-se positiva no qPCR. No grupo com LCLP, das 3 amostras com PCR convencional positivo, 2 eram de pacientes com diagnóstico de LM tardia, que foram confirmadas no qPCR. Quando repetido o PCR do grupo com LCLP utilizando a técnica de qPCR todos aqueles que foram negativos com o convencional mantiveram-se negativos com o qPCR. O que confirma o resultado encontrado uma vez que o qPCR é uma técnica com maior sensibilidade, capaz de detectar níveis baixos de parasita (WEIRATHER et al., 2011). Não se sabe quais fatores explicam a persistência ou eliminação do parasita e o impacto clínico e epidemiológico da persistência do DNA de *Leishmania sp.* na mucosa (MARTÍNEZ-VALENCIA et al., 2017).

Historicamente está descrito que cerca de 3 a 6% dos pacientes com LCL irão apresentar LM concomitante ou tardiamente (BARRAL et al., 1991; BOAVENTURA et al., 2006; JIRMANUS et al., 2012; JONES et al., 1987; MARSDEN, 1986). Alguns fatores têm sido considerados de risco para a LM como o tamanho da lesão cutânea maior do que 4cm, lesões acima da cintura pélvica, tempo de evolução da doença cutânea maior do que 4 meses e tratamento inadequado da lesão cutânea (BLUM et al., 2012; JONES et al.,

1987; LLANOS-CUENTAS et al., 1984b; MACHADO-COELHO et al., 2005; MARSDEN et al., 1984). Dentre os fatores de risco citados acima, o tratamento inadequado da LCL, sem droga leishmanicida ou por tempo inferior ou dose abaixo do recomendado, pode ser potencialmente modificado.

Após reavaliação clínica e otorrinolaringológica de pacientes com história de lesão cutânea por *Leishmania sp.* tratada e clinicamente curada encontramos frequência de 0,6% (2 de 333) de pacientes com lesão mucosa inicial decorrente de leishmaniose. Oliveira-Neto *et al.* avaliando registros de pacientes atendidos por uma década no Hospital Evandro Chagas (RJ) encontraram que entre os 69 casos de LM, 88% não receberam nenhum tipo de tratamento para LCL, enquanto entre os 658 indivíduos tratados para LCL apenas 3 casos (0,4%) apresentaram LM tardia (DE OLIVEIRA-NETO et al., 2000). Em conjunto, esses dados sugerem que nos locais onde há vigilância ativa da LT a frequência histórica de casos de LM entre os LCL (3-6%) pode estar sendo reduzida em consequência do tratamento adequado da doença cutânea. Jirmanus *et al.* demonstrou que na área endêmica de Corte de Pedra - Bahia, nordeste do Brasil, houve redução de 9,1% para 3,3% no número de casos de LM ao longo de 20 anos (JIRMANUS et al., 2012). Sendo possível atribuir essa redução à maior acessibilidade ao serviço de saúde e consequentemente tratamento adequado e precoce da doença cutânea.

O intervalo de tempo entre o episódio passado de LCL e o seu tratamento e o estabelecimento de doença mucosa foi de 20 e 11 anos em cada um dos pacientes com LM da nossa série. Marsden *et al.* encontraram

uma média de 3 a 4 anos entre o episódio de LCL e o de LM, com 46% dos casos de LM ocorrendo antes de 2 anos do episódio prévio de LCL (MARSDEN et al., 1984). Os pacientes que avaliamos com mucosa clinicamente saudável apresentaram uma mediana de 5 anos (IIQ 3, 9) entre o episódio de LCL e a avaliação otorrinolaringológica. Em 89,1% (295/331) esse período foi de 2 anos ou mais, sendo 59,5% (197/331) há pelo menos 5 anos, demonstrando que nossos pacientes foram vistos após período suficiente para ocorrer o aparecimento de eventual lesão mucosa. Em relação aos demais fatores de risco, apenas um dos pacientes com LM teve lesão cutânea maior do que 4cm (um tinha lesão de 10cm e o outro de 2cm), ambos tinham a lesão em pernas e duração da doença até o diagnóstico de 30 dias.

Os dois pacientes diagnosticados com LM apresentavam lesão mucosa bem inicial, restrita ao septo nasal anterior e cabeça do corneto inferior, sem deformidades faciais, semelhantemente ao que foi descrito por Boaventura *et al.* para os casos de LM concomitante (BOAVENTURA et al., 2006). A fossa nasal é a área mucosa mais afetada pela LM (BOAVENTURA et al., 2006; MARSDEN et al., 1984), 100% dos casos são afetados quando há múltiplas lesões mucosas e 92% em casos com lesão única (MARSDEN et al., 1984). Ambos pacientes com LM queixavam-se de obstrução nasal e epistaxe (sangramento nasal), apenas um deles referia crostas e rinorréia purulenta. Epistaxe, secreção nasal persistente, obstrução nasal e crostas podem ser todos sinais iniciais de LM (MARSDEN et al., 1984). Obstrução nasal é um sintoma bastante inespecífico podendo ser comum a diversos quadros nasais como rinopatias, rinosinusite, desvio septal, hipertrofia de

cornetos inferiores, tumores nasais e outras. A obstrução nasal foi a segunda queixa mais frequente entre os nossos pacientes. Epistaxe foi o sintoma menos referido dentre aqueles com mucosa clinicamente normal (8 de 331). Sua presença chama a atenção para a possibilidade de doença granulomatosa, especialmente quando associada à presença de crostas nasais. Apesar de apenas um dos dois pacientes com LM ter apresentado crostas em fossas nasais, este sintoma não é tão comum entre pacientes sem doença granulomatosa (apenas 7 de 331 pacientes referiram presença de crostas em fossas nasais). A presença de sintomas como epistaxe e crostas em fossas nasais, apesar de sozinhos não fecharem o diagnóstico para LM, deve chamar a atenção do profissional que atende o paciente em área endêmica para leishmaniose para a possibilidade de LM e realizar a avaliação necessária para elucidar o diagnóstico. A IDRM foi consideravelmente maior no paciente com LM (24mm) em comparação aos indivíduos com passado de LCL e mucosa clinicamente saudável que apresentavam queixas nasais ($14,5 \pm 5,9$ mm). A presença de uma IDRM positiva em pacientes com passado de LCL pode não funcionar como marcador para LM tardia, mas a extensão da endureção pode chamar a atenção já que os pacientes com LM apresentam maior endureção.

No presente estudo, os dois pacientes com suspeita clínica de LM que foram confirmados após histopatologia, com identificação do parasite em uma das amostras, e PCR do tecido da biópsia, tiveram positivo o PCR 150/152 e qPCR nas amostras de swab nasal, com sequenciamento revelando tratar-se de *L. braziliensis*. Amostras de swab nasal têm sido testadas para ajudar no diagnóstico de LM (BOGGILD et al., 2011; GOMES et al., 2014). Boggild et

al. encontraram sensibilidade de 95,7% para amostras de swab nasal no diagnóstico de pacientes com suspeita para LM (BOGGILD et al., 2011). A sensibilidade mostrou-se consideravelmente maior que a histopatologia (21,7%) e semelhante ao padrão-ouro que é o PCR de espécimes obtidos por biópsia (95,7%) (BOGGILD et al., 2011).

Frente aos sintomas nasais e achados de exame físico inespecíficos que podem ser encontrados nos pacientes com LM e, muitas vezes, à dificuldade no acesso à avaliação pelo especialista otorrinolaringologista na área endêmica, geralmente em localização remota e longe dos grandes centros urbanos, chamamos atenção para a possibilidade do swab nasal como ferramenta diagnóstica para LM. O swab nasal pode ser usado como ferramenta diagnóstica de fácil aplicação, não sendo necessária a presença do especialista em campo para sua coleta. Uma vez encaminhado para análise laboratorial serviria como método de rastreio para seleção de pacientes a serem encaminhados para avaliação otorrinolaringológica.

Reconhecemos algumas limitações do estudo, dentre eles o desenho de estudo, que por ter sido um corte transversal não nos permitiu acompanhar os pacientes com o PCR do swab nasal positivo na LCL aguda a fim de observar a eventual ocorrência de lesão mucosa. Além da falta de amostras de swab nasal logo após o tratamento no grupo de LCL ativa que impossibilitou verificar se a redução na identificação do DNA de *Leishmania* ocorre desde logo após o tratamento; e a falta de um grupo de controle, tratado inadequadamente para LCL, para melhor avaliar esse fator como de risco para LM.

IX. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

1. Testar a utilização do swab nasal como ferramenta diagnóstica para LM.
2. Verificar a positividade do swab nasal em indivíduos com IDRMs positiva residentes em área endêmica.
3. Tentar isolar os parasitas da mucosa de casos de LM e comparar com seus isolados de lesão cutânea prévia.

X. CONCLUSÕES

1. Há tropismo da Leishmania para mucosa nasal na LCL aguda, principalmente entre indivíduos que evoluíram para formas atípicas da LCL e que foram resistentes ao tratamento.
2. Longo período após tratamento adequado da LCL detectou-se parasita na mucosa apenas nos casos com LM ativa.

XI. SUMMARY

ANALYSIS OF LEISHMANIA BRAZILIENSIS TROPISM FOR THE NASAL MUCOSA BEFORE AND LONG TIME AFTER TREATMENT OF LOCALIZED CUTANEOUS LEISHMANIASIS

BACKGROUND: *Leishmania* can be present on nasal mucosa at active CL, with a decrease early after treatment. However it remains unknown if the risk of parasite persistence and mucosal injury can be reduced long term after proper treatment. **OBJECTIVE:** We aim to compare the frequency of *Leishmania* detection in nasal mucosa of patients with acute LCL and individuals with past treated LCL. **METHODOLOGY:** A cross-sectional study with otorhinolaryngologic evaluation of an acute LCL (ALCL) group, before treatment, with 157 patients and a past treated LCL group with 333 patients. Patients with history of LCL (PLCL) were treated with leishmanicidal drugs and had clinical cure registered on clinical records by an infectologist. Nasal swab samples were collected in all patients and tested for PCR. Nasal biopsy was performed on cases with clinically suspected mucosal lesion. **RESULTS:** On ALCL group there was a 7,6% of positivity of nasal swab samples on PCR test while it was 0,9% ($p < 0,001$) on PLCL after a median time of 5 years of proper treatment with complete healing of the cutaneous ulcer. Patients in the ALCL group with positive PCR on nasal swab needed more cycles of meglumine antimoniate to reach clinical cure when compared to those with a negative PCR ($p < 0,05$) and evolved more frequently to atypical forms as *recidiva cutis* and/or disseminated leishmaniasis ($p < 0,05$). Of the 333 patients with LCL history treated with leishmanicidal drugs were identified two cases (0,6%) of active mucosal injury by *Leishmania*, 20 and 11 years after LCL episode. These patients presented injury restricted to the nasal mucosal, with epistaxis, hyperemia, crusting and granulomatous aspect and were the only ones with positive PCR from nasal swab. Parasite was identified on histopathology in one of them and gene sequencing confirmed *Leishmania braziliensis*. **CONCLUSION:** There is a tropism of *Leishmania* to nasal mucosa at acute LCL, especially among individuals who evolved to atypical forms of LCL and with initial therapeutic failure. Long term after adequate LCL treatment parasite was detected in nasal mucosa only in cases with active ML.

Key words: 1. Mucocutaneous leishmaniasis; 2. Nasal mucosa; 3. *Leishmania braziliensis*; 4. Polymerase chain reaction.

XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMATO, V. S.; DE PAULA, J. G.; IMAMURA, R.; AMATO NETO, V.; DUARTE, M. I.; BOULOS, M.; NICODEMO, A. C.; DE MENDONCA, J. S. Treatment of american cutaneous leishmaniasis, with lesions in the mucosa, using pentamidine isethionate. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 29, n. 5, p. 477–481, 1996.
2. AMATO, V. S.; TUON, F. F.; IMAMURA, R.; ABEGÃO DE CAMARGO, R.; DUARTE, M. I.; NETO, V. A. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, v. 23, n. 9, p. 1026–34, 2009.
3. ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 12–13, p. 1269–1281, 2000.
4. AUBART, F. C.; OUAYOUN, M.; BRAUNER, M.; ATTALI, P.; KAMBOUCHNER, M.; VALEYRE, D.; NUNES, H. Sinonasal involvement in sarcoidosis: a case-control study of 20 patients. *Medicine*, v. 85, n. 6, p. 365–71, 2006.
5. BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI, G. J.; MOMEN, H.; MACMAHON-PRATT, D.; JESUS, A. R.; ALMEIDA, R.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETO, M.; CARVALHO, E. M.; JOHNSON, W. D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis*

- produces a wide spectrum of clinical disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 44, p. 536–546, 1991.
6. BLUM, J.; LOCKWOOD, D. N. J.; VISSER, L.; HARMS, G.; BAILEY, M. S.; CAUMES, E.; CLERINX, J.; VAN THIEL, P. P. A. M.; MORIZOT, G.; HATZ, C.; BUFFET, P. Local or systemic treatment for New World cutaneous leishmaniasis? Re-evaluating the evidence for the risk of mucosal leishmaniasis. *International Health*, v. 4, n. 3, p. 153–163, 2012.
 7. BOAVENTURA, V. S.; CAFE, V.; COSTA, J.; OLIVEIRA, F.; BAFICA, A.; ROSATO, A.; DE FREITAS, L. A. R.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Short report: Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 75, n. 2, p. 267–269, 2006.
 8. BOAVENTURA, V. S.; DE OLIVEIRA, J. G. S.; COSTA, J. M. L.; NOVAIS, F. O.; DE OLIVEIRA, C. I.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Short report: The value of the otorhinolaryngologic exam in correct mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, n. 3, p. 384–386, 2009.
 9. BOGGILD, A. K.; VALENCIA, B. M.; VELAND, N.; RAMOS, A. P.; CALDERON, F.; AREVALO, J.; LOW, D. E.; LLANOS-CUENTAS, A. Non-invasive cytology brush pcr diagnostic testing in mucosal leishmaniasis: Superior performance to conventional biopsy with histopathology. *PLoS ONE*, v. 6, n. 10, p. 2–7, 2011.
 10. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual for Surveillance of American Integumentary Leishmaniasis. 2007.

11. BRAUN, J. J.; GENTINE, A.; PAULI, G. Sinonasal Sarcoidosis: Review and Report of Fifteen Cases. *The Laryngoscope*, v. 114, n. 11, p. 1960–1963, 2004.
12. CANNADY, S. B.; BATRA, P. S.; KOENING, C.; LORENZ, R. R.; CITARDI, M. J.; LANGFORD, C.; HOFFMAN, G. S. Sinonasal Wegener granulomatosis: A single-institution experience with 120 cases. *Laryngoscope*, v. 119, n. 4, p. 757–761, 2009.
13. CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.
14. DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*, v. 22, n. 6, p. 491–502, 2009.
15. DE OLIVEIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M. S.; PEREZ, M. A.; DA-CRUZ, A. M.; FERNANDES, O.; MOREIRA, J.; GONÇALVES-COSTA, S. C.; BRAHIN, L. R.; MENEZES, C. R.; PIRMEZ, C. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *International journal of dermatology*, v. 39, n. 7, p. 506–14, 2000.
16. DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; DE MORAIS, R. C. S.; PESSOA-E-SILVA, R.; TRAJANO-SILVA, L. A. M.; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. DA C.; TAVARES, D. DE H. C.; BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A.; SILVA, R. DE F. E.; PEREIRA, V. R. A. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell & Bioscience*, v. 5, n. 1, p. 31, 2015.
17. FIGUEROA, R.; LOZANO, L.; ROMERO, I.; CARDONA, M.; PRAGER,

- M.; PACHECO, R.; DIAZ, Y.; TELLEZ, J.; SARAVIA, N. G. Detection of Leishmania in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) species. *The Journal of infectious diseases*, v. 200, p. 638–646, 2009.
18. GOMES, C. M.; DE PAULA, N. A.; CESETTI, M. V.; ROSELINO, A. M.; SAMPAIO, R. N. R. Mucocutaneous leishmaniasis: Accuracy and molecular validation of noninvasive procedures in a L. (V.) braziliensis-endemic area. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 79, n. 4, p. 413–418, 2014.
19. GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.
20. GUIMARÃES, M. C.; CELESTE, B. J.; FRANCO, E. L.; CUCÉ, L. C.; BELDA, W. Evaluation of serological diagnostic indices for mucocutaneous leishmaniasis: immunofluorescence tests and enzyme-linked immunoassays for IgG, IgM and IgA antibodies. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 67, n. 6, p. 643–8, 1989.
21. HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95–98, 1999.
22. HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *The Lancet*, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 1999.
23. HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; OTTESEN, E.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis,

- and malaria: A comprehensive pro-poor health policy and strategy for the developing world. *PLoS Medicine*, v. 3, n. 5, p. 576–584, 2006.
24. HOTEZ, P. J.; REMME, J. H. F.; BUSS, P.; ALLEYNE, G.; MOREL, C.; BREMAN, J. G. Combating Tropical Infectious Diseases: Report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clinical Infectious Diseases*, v. 38, n. 6, p. 871–878, 2004.
25. JIRMANUS, L.; GLESBY, M. J.; GUIMARATES, L. H.; LAGO, E.; ROSA, M. E.; MACHADO, P. R.; CARVALHO, E. M. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 86, n. 3, p. 426–433, 2012.
26. JONES, T. C.; JOHNSON, W. D.; BARRETTO, A. C.; LAGO, E.; BADARO, R.; CERF, B.; REED, S. G.; NETTO, E. M.; TADA, M. S.; FRANCA, T. F. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *The Journal of infectious diseases*, v. 156, n. 1, p. 73–83, 1987.
27. KAR, K. Serodiagnosis of Leishmaniasis. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 21, n. 2, p. 123–152, 1995.
28. LAWSON, W.; JIANG, N.; CHENG, J. Sinonasal sarcoidosis: A new system of classification acting as a guide to diagnosis and treatment. *American Journal of Rhinology and Allergy*, v. 28, n. 4, p. 317–322, 2014.
29. LLANOS-CUENTAS, E. A.; MARSDEN, P. D.; CUBA, C. C.; BARRETO, A. C.; CAMPOS, M. Possible risk factors in development of

- mucosal lesions in leishmaniasis. *The Lancet*, v. august 4, p. 295, 1984a.
30. LLANOS-CUENTAS, E. A.; MARSDEN, P. D.; LAGO, E. L.; BARRETO, A. C.; CUBA, C. C.; JOHNSON, W. D. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia - Brazil: an area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. II. Cutaneous disease. Presentation and evolution. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 17, n. 4, p. 169–177, 1984b.
31. MACHADO-COELHO, G. L. L.; CAIAFFA, W. T.; GENARO, O.; MAGALHÃES, P. A.; MAYRINK, W. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 99, n. 1, p. 55–61, 2005.
32. MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, n. 6, p. 859–876, 1986.
33. MARSDEN, P. D.; LLANOS-CUENTAS, E. A.; LAGO, E. L.; CUBA, C. C.; BARRETO, A. C.; COSTA, J. M.; JONES, T. C. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia - Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. III. Mucosal disease presentation and initial evolution. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 17, p. 179–186, 1984.
34. MARTÍNEZ-VALENCIA, A. J.; DAZA-RIVERA, C. F.; ROSALES-CHILAMA, M.; COSSIO, A.; CASADIEGO RINCÓN, E. J.; DESAI, M. M.; SARAVIA, N. G.; GÓMEZ, M. A. Clinical and parasitological factors

- in parasite persistence after treatment and clinical cure of cutaneous leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 7, p. 1–15, 2017.
35. MARTINS, A. C. C.; DE CARVALHO E CASTRO, J.; MOREIRA, J. S. A ten-year historic study of paranasal cavity endoscopy in patients with leprosy. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v. 71, n. 5, p. 609–615, 2005.
36. MEYBECK, A.; JUST, N.; HEURTEBISE, F.; CHANEZ, P.; CRAMPETTE, L.; DARRAS, J.; WALLAERT, B. Involvement of the nasal sinuses in sarcoidosis. A prospective study of 63 patients. *Revue des Maladies Respiratoires*, v. 21, n. 2, p. 279–286, 2004.
37. OLIVEIRA, J. G. S.; NOVAIS, F. O.; DE OLIVEIRA, C. I.; DA CRUZ, A. C.; CAMPOS, L. F.; DA ROCHA, A. V.; BOAVENTURA, V.; NORONHA, A.; COSTA, J. M. L.; BARRAL, A. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Tropica*, v. 94, n. 1, p. 55–59, 2005.
38. OSORIO, L. E.; CASTILLO, C. M.; OCHOA, M. T. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia: clinical characteristics. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 59, n. 1, p. 49–52, 1998.
39. REED, S. G. Diagnosis of leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*, v. 14, n. 5, p. 471–478, 1996.
40. REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S.; WASHINGTON, G.; LEOPOLD, P.; BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis.

- Clinics in Dermatology*, v. 25, n. 2, p. 203–11, 2007.
41. SASSI, A.; LOUZIR, H.; SALAH, A. BEN; MOKNI, M.; OSMAN, A. BEN; DELLAGI, K. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 116, n. 1, p. 127–132, 1999.
42. SCHUBACH, A.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A. V.; SARTORI, A.; DE OLIVEIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M. S.; ARAÚJO, M. L.; SOUZA, W. J. S.; HADDAD, F.; PEREZ, M. D. A.; PACHECO, R. S.; MOMEN, H.; COUTINHO, S. G.; DE ALMEIDA MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B. F.; GONÇALVES DA COSTA, S. C. Leishmanial Antigens in the Diagnosis of Active Lesions and Ancient Scars of American Tegumentary Leishmaniasis Patients. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 7, p. 987–996, 2001.
43. SHAW, J. J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE.*, v. 69, n. 3, p. 323–335, 1975.
44. TUON, F. F.; GOMES-SILVA, A.; DA-CRUZ, A. M.; DUARTE, M. I. S.; NETO, V. A.; AMATO, V. S. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. *Clinical Immunology*, v. 128, n. 3, p. 442–446, 2008.
45. WEIRATHER, J. L.; JERONIMO, S. M. B.; GAUTAM, S.; SUNDAR, S.; KANG, M.; KURTZ, M. A.; HAQUE, R.; SCHRIEFER, A.; TALHARI, S.;

- CARVALHO, E. M.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 11, p. 3892–3904, 2011.
46. WHO. **World Health Organization (WHO)**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 2 nov. 2017a.
47. WHO. **World Health Organization (WHO)**. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 2 nov. 2017b.
48. WILSON, R.; LUND, V.; SWEATMAN, M.; MACKAY, I. S.; MITCHELL, D. N. Upper respiratory tract involvement in sarcoidosis and its management. *European Respiratory Journal*, v. 1, n. 3, p. 269–272, 1988.
49. ZEITLIN, J. F.; TAMI, T. A; BAUGHMAN, R.; WINGET, D. Nasal and sinus manifestations of sarcoidosis. *American journal of rhinology*, v. 14, n. 3, p. 157–61, 2015.

ANEXOS

ANEXO 1

FICHA CLÍNICA LTMu: _____. LTAJ () ou LTCP () - COLOCAR NÚMERO

Nome completo: _____.

Apelido: _____. Sexo: (M) (F)

Data de nascimento: _____.

Endereço: _____

_____.

TCLE: () OK // Coleta nasal: () OK // IDRM nova: _____.

1. Há quanto tempo teve diagnóstico de LC? Data do Dx?

2. Como foi feito o diagnóstico?

Fez IDRM? () sim – Qual valor em mm? _____

() Não

Fez biópsia? () Sim – resultado: número PC _____ / () positiva/ () negativa

Fez sorologia? () Sim / () não

3. Fez tratamento? () Sim ou () Não 3.1. Se sim, qual a droga?

() Glucantime - Número de ampolas: _____

- Duração tratamento: _____

() Anfotericina - Duração tratamento: _____

() Pentamidina - Duração tratamento: _____

() Pentoxifilina - Duração tratamento: _____

() Azitromicina - Duração tratamento: _____

4. Localização da lesão de maior tamanho:

() membro inferior

() membro superior

() tronco

() face

() outra localização

5. Tamanho da maior lesão (em cm): _____

6. Presença de linfonodomegalia? () Sim / () Não

7. cura clínica? () sim / () Não

se sim: data cura _____

ANEXO 2

CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO
MONIZ - FIOCRUZ/BA

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação da sensibilidade e especificidade de novos métodos para o diagnóstico de leishmaniose mucosa

Pesquisador: Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 18355513.6.0000.0040

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 484.908

Data da Relatoria: 28/11/2013

Apresentação do Projeto:

A proponente solicita a inclusão da Santa Casa de Misericórdia da Bahia- Hospital Santa Izabel como instituição co-participante neste projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Não se aplica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Recomendações: Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Situação do Parecer: Aprovado

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121 **Bairro:** Candeal **CEP:** 40.296-710 **UF:** BA **Município:** SALVADOR **Telefone:** (71)3176-2327 **Fax:** (71)3176-2285 **E-mail:** cep@bahia.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA



Continuação do Parecer: 484.908

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SALVADOR, 09 de Dezembro de 2013

Assinador por:

Adriana Lanfredi Rangel (Coordenador)

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121 **Bairro:** Candeal **CEP:** 40.296-710 **UF:** BA

Município: SALVADOR **Telefone:** (71)3176-2327 **Fax:** (71)3176-2285 **E-mail:**
cep@bahia.fiocruz.br

ANEXO 3

**CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ - FIOCRUZ/BA****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo das formas de difícil tratamento da leishmaniose tegumentar: Leishmaniose mucosa e da Leishmaniose recidiva cutis.

Pesquisador: aldina maria prado barral

Área Temática:Versão: 3

CAAE: 18113113.2.0000.0040

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 477.854

Data da Relatoria: 03/12/2013

Apresentação do Projeto:

"A leishmaniose tegumentar (LT) é um importante problema de saúde na Bahia. Algumas formas clínicas da leishmaniose cutânea são conhecidas pela sua dificuldade de tratamento entre elas temos a leishmaniose mucosa (LM) e a leishmaniose recidiva cutis (LRC). Tanto a LM quanto a LRC são apresentações clínicas que aparecem após o tratamento inicial de casos de LT, ambas são de difícil diagnóstico e o seu reconhecimento tardio dificulta o tratamento."

Objetivo da Pesquisa:

"Aperfeiçoar o tratamento das formas de leishmaniose tegumentar humana que apresentam dificuldade de diagnóstico e de tratamento, nomeadamente a leishmaniose recidiva cutis (LRC) e a leishmaniose mucosa (LM), com base no grande número de casos observados na região do Vale de Jequiçá, Bahia, Brasil.1. Avaliar a efetividade do exame otorrinolaringológico em diagnosticar casos recentes de LM comparado com o exame clínico de rotina; 2. Determinar o número de cursos de tratamento necessários para alcançar a cura clínica nos casos de LM e LRC;3. Avaliar a positividade em biomarcadores de inflamação como auxiliar na detecção de casos de LM e de LRC;

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121 **Bairro:** Candeal **CEP:** 40.296-710 **UF:** BA **Município:** SALVADOR **Telefone:** (71)3176-2327 **Fax:** (71)3176-2285 **E-mail:** cep@bahia.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA



Continuação do Parecer: 477.854

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Comentários realizados anteriormente. De acordo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Comentários realizados anteriormente. De acordo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Comentários realizados anteriormente. Inadequações estão agora em acordo com as resoluções vigentes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Vigência após aprovação: 12/2013-06/2016.

Apresentar relatórios parciais a cada seis meses e o final.

SALVADOR, 03 de Dezembro de 2013

Assinador por:

Adriana Lanfredi Rangel (Coordenador)

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121 **Bairro:** Candeal **CEP:** 40.296-710 **UF:** BA

Município: SALVADOR **Telefone:** (71)3176-2327 **Fax:** (71)3176-2285 **E-mail:**
cep@bahia.fiocruz.br

ANEXO 4**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Convidamos _____a participar de deste estudo que é uma pesquisa e que tem por objetivo avaliar o valor de dois novos exames no diagnóstico de leishmaniose mucosa. A participação neste estudo é voluntária e não remunerada e não haverá qualquer prejuízo no seu acompanhamento ou tratamento caso não queira participar. Você responderá a um questionário com perguntas sobre a sua doença e possíveis vias e contaminação; Está prevista a utilização de uma amostra do soro que é obtido do sangue retirado para exame diagnóstico habitual de leishmaniose. Além disso, será realizada a coleta de secreção nasal utilizando uma haste semelhante a um cotonete. Ao final do estudo as amostras serão descartadas ou armazenadas no laboratório, respeitando a legislação vigente. Os resultados serão considerados confidenciais, serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a sua identificação individual. A doutora Viviane Boaventura discutiu comigo esta informação e colocou-se a disposição para outras perguntas através do telefone – (71) 3176-2286 ou no endereço – FIOCRUZ – Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz- Rua Waldemar Falcão, 121, Brotas. Caixa Postal 701- CEP – 40296-710. Salvador-Bahia. Você também poderá entrar em contato com o comitê de ética que julgou esse estudo, cujo endereço está representado acima. Você também entrar em contato com o comitê de ética

que julgou esse estudo (Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Osvaldo Cruz-Rua Waldemar Falcão, 121, Brotas. Tel – 3176-2385)

Todos os resultados serão considerados confidenciais e serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a sua identificação individual. Os resultados dos exames realizados para a confirmação diagnóstica serão disponibilizados ao paciente. Os laudos serão entregues impressos na consulta médica entre sete e 30 dias após a realização.

A sua participação neste estudo é voluntária e você está livre para recusar participar ou se retirar em qualquer época após seu início sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que deverá receber.

Você receberá uma cópia desse formulário.

Caso autorize o armazenamento de amostras para utilização em pesquisas futuras favor assinalar abaixo:

SIM, autorizo NAO autorizo

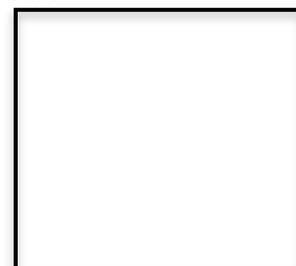
Caso autorize acesso aos dados do seu prontuário em pesquisas futuras favor assinalar abaixo:

SIM, autorizo NAO autorizo

Pelo presente consente voluntariamente em participar deste estudo.

Ass. e RG do Voluntário

Ass. e RG do Médico



ANEXO 5

Submission Guidelines

PLOS Neglected Tropical Diseases publishes original research articles of importance to the NTDs community and the wider health community. We will consider manuscripts of any length; we encourage the submission of both substantial full-length bodies of work and shorter manuscripts that report novel findings that might be based on a more limited range of experiments.

The writing style should be concise and accessible, avoiding jargon so that the paper is understandable for readers outside a specialty or those whose first language is not English. Editors will make suggestions for how to achieve this, as well as suggestions for cuts or additions that could be made to the article to strengthen the argument. Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, but not intrusive or overbearing. Authors are encouraged to use their own voice and to decide how best to present their ideas, results, and conclusions.

PLOS Neglected Tropical Diseases is committed to the highest ethical standards in medical research. Accordingly, we ask authors to provide specific information regarding ethical treatment of research participants, patient consent, patient privacy, protocols, authorship, and competing interests. We also ask that reports of certain specific types of studies adhere to generally accepted standards. Our requirements are based on the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#), issued by the International Committee for Medical Journal Editors

Style and Format

File format	Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, RTF, or PDF. Microsoft Word documents should not be locked or protected. LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. Read the LaTeX guidelines.										
Length	Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information. We encourage you to present and discuss your findings concisely.										
Font	Use a standard font size and any standard font, except for the font named “Symbol”. To add symbols to the manuscript, use the Insert → Symbol function in your word processor or paste in the appropriate Unicode character.										
Headings	Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.										
Layout and spacing	Manuscript text should be double-spaced. Do not format text in multiple columns.										
Page and line numbers	Include page numbers and line numbers in the manuscript file. Use continuous line numbers (do not restart the numbering on each page).										
Footnotes	Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list depending on the content.										
Language	Manuscripts must be submitted in English. You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. Read the supporting information guidelines.										
Abbreviations	Define abbreviations upon first appearance in the text. Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text. Keep abbreviations to a minimum.										
Reference style	PLOS uses “Vancouver” style, as outlined in the ICMJE sample references . See reference formatting examples and additional instructions below.										
Equations	We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor or Microsoft's Insert→Equation function is acceptable. Avoid using MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function to insert single variables (e.g., “ $a^2 + b^2 = c^2$ ”), Greek other symbols (e.g., β , Δ , or ' [prime]), or mathematical operators (e.g., \times , \geq , or \pm) in running text. Wherever possible, insert single symbols as normal text with the correct Unicode (hex) values. Do not use MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function for only a portion of an equation. Rather, ensure that the entire equation is included. Equations should not contain a mix of different equation tools. Avoid “hybrid” inline or display equations, in which part is text and part is MathType, or part is MathType and part is Equation Editor.										
Nomenclature	Use correct and established nomenclature wherever possible.										
	<table border="1"> <tr> <td><i>Units of measurement</i></td> <td>Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units.</td> </tr> <tr> <td><i>Drugs</i></td> <td>Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).</td> </tr> <tr> <td><i>Species names</i></td> <td>Write in italics (e.g., <i>Homo sapiens</i>). Write out in full the genus and species, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., <i>H. sapiens</i>).</td> </tr> <tr> <td><i>Genes, mutations, genotypes, and alleles</i></td> <td>Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., HUGO for human genes). It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC).</td> </tr> <tr> <td><i>Allergens</i></td> <td>The systematic allergen nomenclature of the World Health Organization/International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-committee should be used for manuscripts that include the description or use of allergenic proteins. For manuscripts describing new allergens, the systematic name of the allergen should be approved by the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee prior to manuscript publication. Examples of</td> </tr> </table>	<i>Units of measurement</i>	Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units.	<i>Drugs</i>	Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).	<i>Species names</i>	Write in italics (e.g., <i>Homo sapiens</i>). Write out in full the genus and species, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., <i>H. sapiens</i>).	<i>Genes, mutations, genotypes, and alleles</i>	Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., HUGO for human genes). It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC).	<i>Allergens</i>	The systematic allergen nomenclature of the World Health Organization/International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-committee should be used for manuscripts that include the description or use of allergenic proteins. For manuscripts describing new allergens, the systematic name of the allergen should be approved by the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee prior to manuscript publication. Examples of
<i>Units of measurement</i>	Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units.										
<i>Drugs</i>	Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).										
<i>Species names</i>	Write in italics (e.g., <i>Homo sapiens</i>). Write out in full the genus and species, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., <i>H. sapiens</i>).										
<i>Genes, mutations, genotypes, and alleles</i>	Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., HUGO for human genes). It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC).										
<i>Allergens</i>	The systematic allergen nomenclature of the World Health Organization/International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-committee should be used for manuscripts that include the description or use of allergenic proteins. For manuscripts describing new allergens, the systematic name of the allergen should be approved by the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee prior to manuscript publication. Examples of										

the systematic allergen nomenclature can be found at [the WHO/IUIS Allergen Nomenclature site](#).

Manuscript Organization

Most manuscripts should be organized as follows. Instructions for each element appear below.

- Title
- Authors and Affiliations
- Abstract
- Author Summary
- Introduction
- Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgments
- References
- Supporting information Captions

Uniformity in format facilitates the experience of readers and users of the journal. To provide flexibility, however, the Results and Discussion can be combined into one Results/Discussion section.

Other elements

- Figure captions are inserted immediately after the first paragraph in which the figure is cited. Figure files are uploaded separately.
- Tables are inserted immediately after the first paragraph in which they are cited.
- Supporting information files are uploaded separately.

Parts of a Submission

Title

Include a full title and a short title for the manuscript.

Title	Length	Guidelines	Examples
Full title	250 characters	Specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the field	Impact of cigarette smoke exposure on innate immunity: A <i>Caenorhabditis elegans</i> model Solar drinking water disinfection (SODIS) to reduce child diarrhoea in rural Bolivia: A cluster-randomized, controlled trial
Short title	70 characters	State the topic of the study	Cigarette smoke exposure and innate immunity SODIS and childhood diarrhoea

Titles should be written in sentence case (only the first word of the text, proper nouns, and genus names are capitalized). Avoid specialist abbreviations if possible. For clinical trials, systematic reviews, or meta-analyses, the subtitle should include the study design.

Author list

Authorship requirements

All authors must meet the criteria for authorship as outlined in the [authorship policy](#). Those who contributed to the work but do not meet the criteria for authorship can be mentioned in the Acknowledgments. [Read more about Acknowledgments](#).

The corresponding author must provide an ORCID iD at the time of submission by entering it in the user profile in the submission system. [Read more about ORCID](#).

Author names and affiliations

Enter author names on the title page of the manuscript and in the online submission system.

On the title page, write author names in the following order:

- First name (or initials, if used)
- Middle name (or initials, if used)
- Last name (surname, family name)

Each author on the list must have an affiliation. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. Authors have the option to include a current address in addition to the address of their affiliation at the time of the study. The current address should be listed in the byline and clearly labeled “current address.” At a minimum, the address must include the author’s current institution, city, and country.

If an author has multiple affiliations, enter all affiliations on the title page only. In the submission system, enter only the preferred or primary affiliation. Author affiliations will be listed in the typeset PDF article in the same order that authors are listed in the submission.

Author names will be published exactly as they appear in the manuscript file. Please double-check the information carefully to make sure it is correct.

Corresponding author

The submitting author is automatically designated as the corresponding author in the submission system. The corresponding author is the primary contact for the journal office and the only author able to view or change the manuscript while it is under editorial consideration.

The corresponding author role may be transferred to another coauthor. However, note that transferring the corresponding author role also transfers access to the manuscript. (To designate a new corresponding author while the manuscript is still under consideration, watch the video tutorial below.)

Only one corresponding author can be designated in the submission system, but this does not restrict the number of corresponding authors that may be listed on the article in the event of publication. Whoever is designated as a corresponding author on the title page of the manuscript file will be listed as such upon publication. Include

an email address for each corresponding author listed on the title page of the manuscript.

Consortia and group authorship

If a manuscript is submitted on behalf of a consortium or group, include the consortium or group name in the author list. The consortium or group name should be listed in the manuscript file only, and not included in the online submission form. You may include the full list of members in the Acknowledgments or in a supporting information file. Please be aware that as of October 2016, only individuals and the names of consortia or group authors listed in the author byline itself will be indexed in PubMed. Individual consortium or group author members need to be listed in the author byline in order to be indexed, and if included in the byline, must qualify for authorship according to our [criteria](#).

Author contributions

Provide at minimum one contribution for each author in the submission system. Use the CRediT taxonomy to describe each contribution. [Read the policy and the full list of roles](#).

Contributions will be published with the final article, and they should accurately reflect contributions to the work. The submitting author is responsible for completing this information at submission, and we expect that all authors will have reviewed, discussed, and agreed to their individual contributions ahead of this time.

Cover letter

Upload a cover letter as a separate file in the online system.

The cover letter should address the following questions:

- Why is this manuscript suitable for publication in *PLOS Neglected Tropical Diseases*?
- Why will your study inspire the NTDs community, and how will it drive the understanding of NTD pathobiology, epidemiology, prevention, treatment, control, or policy?

If your study addresses an infection that is outside our [detailed scope](#), you must first send a presubmission inquiry indicating why you consider the infection to be a neglected tropical disease.

The cover letter will be available to the editors and to any external peer reviewers, so please send anything confidential directly to the journal office.

Title page

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

Abstract

The Abstract comes after the title page in the manuscript file. The abstract text is also entered in a separate field in the submission system.

The Abstract succinctly introduces the paper. It should not exceed 250–300 words. It should mention the techniques used without going into methodological detail and summarize the most important results with important numerical results given.

The Abstract is conceptually divided into the following three sections with these headings: Background, Methodology/Principal Findings, and Conclusions/Significance.

Do not include any citations in the Abstract. Avoid specialist abbreviations.

Author Summary

We ask that all authors of research articles include a 150- to 200-word non-technical summary of the work, immediately following the Abstract. Subject to editorial review and author revision, this short text is published with all research articles as a highlighted text box.

Distinct from the scientific abstract, the Author Summary should highlight where the work fits in a broader context of life science knowledge and why these findings are important to an audience that includes both scientists and non-scientists. Ideally aimed to a level of understanding of an undergraduate student, the significance of the work should be presented simply, objectively, and without exaggeration.

Authors should avoid the use of acronyms and complex scientific terms and write the author summary using the first-person voice. Authors may benefit from consulting with a science writer or press officer to ensure that they effectively communicate their findings to a general audience.

Introduction

The Introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the Introduction, think of readers who are not experts in this field. Include a brief review of the key literature. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about whether that aim was achieved.

Methods

This section should provide enough detail for reproduction of the findings. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be referenced. Detailed methodology or supporting information relevant to the methodology can be published on our web site.

This section should also include a section with descriptions of any statistical methods employed. These should conform to the [criteria outlined by the Uniform Requirements](#), as follows:

Describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to judge its appropriateness for the study and to verify the reported results. When possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty (such as confidence intervals). Avoid relying solely on statistical hypothesis testing, such as P values, which fail to convey important information about effect size and precision of estimates. References for the design of the study and statistical methods should be to standard works when possible (with pages stated). Define statistical terms, abbreviations, and most symbols. Specify the statistical software package(s) and versions used. Distinguish prespecified from exploratory analyses, including subgroup analyses.

Submit detailed protocols for newer or less established methods. Well-established protocols may simply be referenced. Protocol documents for clinical trials, observational studies, and other **non-laboratory** investigations may be uploaded as supporting information.

We recommend and encourage you to deposit **laboratory protocols** in [protocols.io](https://www.protocols.io), where protocols can be assigned their own persistent digital object identifiers (DOIs).

To include a link to a protocol in your article:

1. Describe your step-by-step protocol on [protocols.io](https://www.protocols.io)
2. Select **Get DOI** to issue your protocol a persistent digital object identifier (DOI)
3. Include the DOI link in the Methods section of your manuscript using the following format provided by [protocols.io](https://www.protocols.io):
[http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.\[PROTOCOL DOI\]](http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.[PROTOCOL DOI])

At this stage, your protocol is only visible to those with the link. This allows editors and reviewers to consult your protocol when evaluating the manuscript. You can make your protocols public at any time by selecting **Publish** on the [protocols.io](https://www.protocols.io) site. Any referenced protocol(s) will automatically be made public when your article is published.

Results

The Results section should include all relevant positive and negative findings. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. The Results section should be written in past tense.

PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available without restriction, with rare exception.

Large data sets, including raw data, may be deposited in an appropriate public repository. [See our list of recommended repositories.](#)

For smaller data sets and certain data types, authors may provide their data within [supporting information files](#) accompanying the manuscript. Authors should take care to maximize the accessibility and reusability of the data by selecting a file format from which data can be efficiently extracted (for example, spreadsheets or flat files should be provided rather than PDFs when providing tabulated data).

For more information on how best to provide data, read our [policy on data availability](#). PLOS does not accept references to “data not shown.”

As outlined in the [Uniform Requirements](#), authors that present statistical data in the Results section should do the following:

Give numeric results not only as derivatives (for example, percentages) but also as the absolute numbers from which the derivatives were calculated, and specify the statistical significance attached to them, if any. Restrict tables and figures to those needed to explain the argument of the paper and to assess supporting data. Use graphs as an alternative to tables with many entries; do not duplicate data in graphs and tables. Avoid nontechnical uses of technical terms in statistics, such as “random” (which implies a randomizing device), “normal,” “significant,” “correlations,” and “sample.”

Discussion

The Discussion should be concise and tightly argued. It should start with a brief summary of the main findings. It should include paragraphs on the generalizability, clinical relevance, strengths, and limitations of your study.

You may wish to discuss the following points also:

- How do the conclusions affect the existing knowledge in the field?
- How can future research build on these observations and what are the key experiments that must be done?

Acknowledgments

Those who contributed to the work but do not meet our authorship criteria should be listed in the Acknowledgments with a description of the contribution.

Authors are responsible for ensuring that anyone named in the Acknowledgments agrees to be named.

Do not include funding sources in the Acknowledgments or anywhere else in the manuscript file. Funding information should only be entered in the financial disclosure section of the submission system.

References

Any and all available works can be cited in the reference list. Acceptable sources include:

- Published or accepted manuscripts
- Manuscripts on preprint servers, if the manuscript is submitted to a journal and also publicly available as a preprint

Do not cite the following sources in the reference list:

- Unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., “unpublished work,” “data not shown”). Instead, include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.

- Personal communications (these should be supported by a letter from the relevant authors but not included in the reference list)

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, cite the reference number in square brackets (e.g., “We used the techniques developed by our colleagues [19] to analyze the data”). PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first six authors, et al.

Do not include citations in abstracts or author summaries.

Make sure the parts of the manuscript are in the correct order *before* ordering the citations.

Formatting references

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial.

PLOS uses the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), also referred to as the “Vancouver” style. Example formats are listed below. Additional examples are in the [ICMJE sample references](#).

A reference management tool, EndNote, offers a current [style file](#) that can assist you with the formatting of your references. If you have problems with any reference management program, please contact the source company's technical support.

Journal name abbreviations should be those found in the [National Center for Biotechnology Information \(NCBI\) databases](#).

Source	Format
Published articles	Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). <i>Genet Mol Res</i> . 2011;10: 1576-1588. Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. <i>Mol Immunol</i> . 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005. <i>Note: A DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers.</i>
Accepted, unpublished articles	Same as published articles, but substitute “Forthcoming” for page numbers or DOI.
Web sites or online articles	Huynen MMTE, Martens P, Hilderink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. <i>Glob Health</i> . 2005;1: 14. Available from: http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14
Books	Bates B. <i>Bargaining for life: A social history of tuberculosis</i> . 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.
Book chapters	Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. <i>AIDS and the historian</i> . Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.
Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv)	Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreira DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity; 1991. Preprint. Available from: arXiv:1403.3301v1 . Cited 17 March 2014.
Published media (print or online newspapers and magazine articles)	Fountain H. For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. <i>The New York Times</i> . 29 Jan 2014. Available from: http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html Cited 17 March 2014.
New media (blogs, web)	Allen L. Announcing PLOS Blogs. 2010 Sep 1 [cited 17 March 2014]. In: <i>PLOS Blogs</i> [Internet]. San Francisco

Source	Format
sites, or other written works)	PLOS 2006 - . [about 2 screens]. Available from: http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/ .
Masters' theses or doctoral dissertations	Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available from: http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09
Databases and repositories (Figshare, arXiv)	Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013 [cited 2013 Oct 5]. Database: figshare [Internet]. Available from: http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214
Multimedia (videos, movies, or TV shows)	Hitchcock A, producer and director. Rear Window [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.

Supporting Information

Authors can submit essential supporting files and multimedia files along with their manuscripts. All supporting information will be subject to peer review. All file types can be submitted, but files must be smaller than 10 MB in size.

Authors may use almost any description as the item name for a supporting information file as long as it contains an “S” and number. For example, “S1 Appendix” and “S2 Appendix,” “S1 Table” and “S2 Table,” and so forth.

Supporting information files are published exactly as provided, and are not copyedited.

Supporting information captions

List supporting information captions at the end of the manuscript file. Do not submit captions in a separate file.

The file number and name are required in a caption, and we highly recommend including a one-line title as well. You may also include a legend in your caption, but it is not required.

Example caption

S1 Text. Title is strongly recommended. Legend is optional.

In-text citations

We recommend that you cite supporting information in the manuscript text, but this is not a requirement. If you cite supporting information in the text, citations do not need to be in numerical order.

Figures and Tables

Figures

Do not include figures in the main manuscript file. Each figure must be prepared and submitted as an individual file.

Cite figures in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

Figure captions

Figure captions must be inserted in the text of the manuscript, immediately following the paragraph in which the figure is first cited (read order). Do not include captions as part of the figure files themselves or submit them in a separate document.

At a minimum, include the following in your figure captions:

- A figure label with Arabic numerals, and “Figure” abbreviated to “Fig” (e.g. Fig 1, Fig 2, Fig 3, etc). Match the label of your figure with the name of the file uploaded at submission (e.g. a figure citation of “Fig 1” must refer to a figure file named “Fig1.tif”).
- A concise, descriptive title

The caption may also include a legend as needed.

Tables

Cite tables in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

Place each table in your manuscript file directly after the paragraph in which it is first cited (read order). Do not submit your tables in separate files.

Tables require a label (e.g., “Table 1”) and brief descriptive title to be placed above the table. Place legends, footnotes, and other text below the table.

Data reporting

All data and related metadata underlying the findings reported in a submitted manuscript should be deposited in an appropriate public repository, unless already provided as part of the submitted article.

Repositories may be either subject-specific (where these exist) and accept specific types of structured data, or generalist repositories that accept multiple data types. We recommend that authors select repositories appropriate to their field. Repositories may be subject-specific (e.g., GenBank for sequences and PDB for structures), general, or institutional, as long as DOIs or accession numbers are provided and the data are at least as open as CC BY. Authors are encouraged to select repositories that meet accepted criteria as trustworthy digital repositories, such as criteria of the Centre for Research Libraries or Data Seal of Approval. Large, international databases are more likely to persist than small, local ones.

To support data sharing and author compliance of the PLOS data policy, we have integrated our submission process with a select set of data repositories. The list is neither representative nor exhaustive of the suitable repositories available to authors. Current repository integration partners include [Dryad](#) and [FlowRepository](#). Please contact data@plos.org to make recommendations for further partnerships.

Instructions for PLOS submissions with data deposited in an integration partner repository:

- Deposit data in the integrated repository of choice.

- Once deposition is final and complete, the repository will provide you with a dataset DOI (provisional) and private URL for reviewers to gain access to the data.
- Enter the given data DOI into the full Data Availability Statement, which is requested in the Additional Information section of the PLOS submission form. Then provide the URL passcode in the Attach Files section.

If you have any questions, please [email us](#).

Accession numbers

All appropriate data sets, images, and information should be deposited in an appropriate public repository. [See our list of recommended repositories](#).

Accession numbers (and version numbers, if appropriate) should be provided in the Data Availability Statement. Accession numbers or a citation to the DOI should also be provided when the data set is mentioned within the manuscript.

In some cases authors may not be able to obtain accession numbers of DOIs until the manuscript is accepted; in these cases, the authors must provide these numbers at acceptance. In all other cases, these numbers must be provided at submission.

Identifiers

As much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- [Ensembl](#)
- [Entrez Gene](#)
- [FlyBase](#)
- [InterPro](#)
- [Mouse Genome Database \(MGD\)](#)
- [Online Mendelian Inheritance in Man \(OMIM\)](#)
- [PubChem](#)

Identifiers should be provided in parentheses after the entity on first use.

Small and macromolecule crystal data

Manuscripts reporting new and unpublished three-dimensional structures must include sufficient supporting data and detailed descriptions of the methodologies used to allow the reproduction and validation of the structures. All novel structures must have been deposited in a community endorsed database prior to submission (please see our list of [recommended repositories](#)).

Small molecule single crystal data

Authors reporting X-Ray crystallographic structures of small organic, metal-organic, and inorganic molecules must deposit their data with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD), or similar community databases providing a recognized validation functionality. Authors are also required to include the relevant structure reference numbers within the main text

(e.g. the CCDC ID number), as well as the crystallographic information files (.cif format) as Supplementary Information, along with the checkCIF validation reports that can be obtained via the International Union of Crystallography (IUCr).

Macromolecular structures

Authors reporting novel macromolecular structures must have deposited their data prior to submission with the Worldwide Protein Data Bank (wwPDB), the Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB), the Electron Microscopy Data Bank (EMDB), or other community databases providing a recognized validation functionality. Authors must include the structure reference numbers within the main text and submit as Supplementary Information the official validation reports from these databases.

Striking image

You can choose to upload a “Striking Image” that we may use to represent your article online in places like the journal homepage. All striking image files that are submitted are also eligible to be chosen as the monthly Issue Image.

Submission Criteria

- The image must visually represent the article in a striking and eye-catching way.
- It can be derived from a figure or supporting information file from the paper, and it may be a cropped portion of an image or the entire image.
- Alternatively, you may create or source an image which represents the article, as long as it adheres to our CC BY license.
- High resolution: between 300-600 dpi
- Single panel
- Ideally avoid added details like text, scale bars, and arrows.

How to Submit

1. Submit your striking image to the submission system using the file type “Striking Image”.
2. Upload a separate file containing the corresponding caption.

If no striking image is uploaded, a member of the journal team will choose an appropriate image, which may be a figure from the submission or a separately sourced CC BY image.

Striking images should not contain potentially identifying images of people. [Read our policy on identifying information.](#)

[The PLOS licenses and copyright policy](#) also applies to striking images.

Additional Information Requested at Submission

Funding Statement

This section should describe sources of funding that have supported the work. Please include relevant grant numbers and the URL of any funder's web site. Please also include this sentence: “The funders had no role in study design, data collection

and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.” If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders, and amend the aforementioned sentence as needed.

Competing Interests

The corresponding author is asked at submission to declare, on behalf of all authors, whether there are any financial, personal, or professional interests that could be construed to have influenced the work.

Any relevant competing interests of authors must be available to editors and reviewers during the review process and will be stated in published articles.

Related manuscripts

When submitting a manuscript, all authors are asked to indicate that they do not have a related or duplicate manuscript under consideration (or accepted) for publication elsewhere. If related work has been or will be submitted elsewhere or is in press elsewhere, then a copy must be uploaded with the article submitted to PLOS. Reviewers will be asked to comment on the overlap between related submissions.

PLOS does support authors who wish to share their work early and receive feedback before formal peer review. Deposition of manuscripts with preprint servers does not impact consideration of the manuscript at any PLOS journal.

Authors choosing bioRxiv may now concurrently submit directly to select PLOS journals through [bioRxiv's direct transfer to journal service](#).

Reviewer and editor suggestions

We ask authors to suggest suitable editors and at least four potential reviewers when submitting their manuscript. Bear in mind any potential competing interests when making these suggestions. It is not appropriate to suggest recent collaborators or other researchers at your institution. See our [policy on competing interests](#) for more information.

Observational studies

For observational studies, including case control, cohort, and cross-sectional studies, authors must adhere to the [STROBE Statement](#) or alternative guidelines appropriate to the study design (see the [EQUATOR web site](#)) and include a completed checklist as supporting information. Authors must complete the appropriate reporting checklist not only with page references, but also with sufficient text excerpted from the manuscript to explain how they addressed all applicable items.

For observational studies, authors are required to clearly specify (a) What specific hypotheses the researchers intended to test, and the analytical methods by which they planned to test them; (b) What analyses they actually performed; and (c) When reported analyses differ from those that were planned, authors must provide transparent explanations for differences that affect the reliability of the study's results.

If a prospective analysis plan (from the study's funding proposal, IRB or other ethics committee submission, study protocol, or other planning document written before analyzing the data) was used in designing an observational study, authors must include the relevant prospectively written document with the manuscript submission for access by editors and reviewers and eventual publication alongside the accepted paper. If no prospectively written document exists, authors should explain how and when they determined the analyses being reported.