

# Bases para un tratamiento con hipertermia moderada en leishmaniosis cutánea

Norma del C. Galindo-Sevilla\*

Departamento de Infectología e Inmunología, Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de México, México

## Resumen

**Introducción:** La hipertermia regional entre 38 y 39.5 °C ha sido empleada para tratar procesos inflamatorios y, ocasionalmente, infecciones cutáneas. En zonas endémicas de leishmaniosis se aplican compresas calientes como tratamiento antiparasitario. **Objetivo:** Conocer las bases del tratamiento térmico de la leishmaniosis para regularlo adecuadamente. **Métodos:** Parásitos Leishmania mexicana cultivados *in vitro* fueron incubados por períodos variables de 37 °C y después a 25 °C. Los parásitos se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio para detectar inducción de apoptosis y su viabilidad. Se realizaron curvas de crecimiento posttratamiento e identificación del ciclo celular con anticuerpos anticiclinas. **Resultados:** Despues de 30 minutos de exposición a una temperatura de 37 °C, un porcentaje variable de parásitos perdieron su característica forma ovalada y se tornaron esféricos, sin refringencia y con núcleos condensados, cambios que sugirieron apoptosis, la cual fue confirmada mediante tinción con anexina V-FITC. La cantidad de parásitos en proceso de apoptosis fue proporcional al tiempo de exposición. Los parásitos en los que se observó apoptosis se tiñeron con anticuerpos anticiclinas. **Conclusiones:** La elevación constante, regulada y fisiológica de la temperatura por más de 30 minutos induce apoptosis de parásitos Leishmania mexicana cultivados *in vitro*, cuando se encuentran en fase activa en el ciclo celular.

**PALABRAS CLAVE:** Leishmania mexicana. Leishmaniosis cutánea. Tratamiento. Hipertermia.

## Bases for a treatment of cutaneous leishmaniasis with moderate hyperthermia

## Abstract

**Introduction:** Regional hyperthermia at between 38 and 39.5 °C has been used to treat inflammatory processes and, occasionally, skin infections. In areas where leishmaniasis is endemic, hot compresses are applied as anti-parasitic treatment. **Objective:** To identify the bases of leishmaniasis thermal treatment in order to properly regulate it. **Methods:** *In vitro*-cultured Leishmania mexicana parasites were incubated for variable periods at 37 and then, to 25 °C. The parasites were then stained with Annexin V-FITC to detect apoptosis induction and with propidium iodide for viability. Post-treatment growth curves and cell cycle identification with anti-cyclin antibodies were performed. **Results:** After 30 minutes of exposure to a temperature of 37 °C, a variable proportion of parasites lost their characteristic oval shape and became spherical, without refringence and with condensed nuclei, with these changes suggesting apoptosis, which was confirmed by Annexin V-FITC staining. The number of parasites that underwent apoptosis was proportional to exposure time. Parasites in which apoptosis was observed were stained with anti-cyclin antibodies. **Conclusions:** Constant, regulated and physiological elevation of temperature for more than 30 minutes induces apoptosis of *in vitro*-cultured *L. mexicana* parasites when they are in an active phase of the cell cycle.

**KEYWORDS:** Leishmania mexicana. Cutaneous leishmaniasis. Treatment. Hyperthermia.

## Correspondencia:

\*Norma del C. Galindo-Sevilla

E-mail: ngalindosevilla@hotmail.com

0016-3813/© 2022 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Fecha de recepción: 16-02-2022

Fecha de aceptación: 29-03-2022

DOI: 10.24875/GMM.22000057

Gac Med Mex. 2022;158:219-224

Disponible en PubMed

[www.gacetamedicademexico.com](http://www.gacetamedicademexico.com)

## Introducción

El término termoterapia define el uso de temperatura para el tratamiento de algunos procesos, como el inflamatorio. Cuando la temperatura aplicada es superior a la fisiológica, recibe el nombre de hipertermia. En los humanos, el rango de hipertermia dentro de límites seguros para las células de los tejidos es relativamente pequeño, de 38 a 43 °C. La hipertermia se subclasifica en moderada (de 38 a 39.5 °C) o alta (de 40 a 43 °C).<sup>1</sup> Cada grado de incremento en la temperatura modifica de forma diferente los procesos celulares, con lo que se observan variaciones en la expresión de proteínas, incluidas las citocinas,<sup>2</sup> así como en la proporción de células que las expresan.<sup>3</sup> En general, la hipertermia moderada es no invasiva y se aplica en forma externa con vapor de agua o con fuentes radiantes de calor, como cojines eléctricos o compresas con reacciones químicas exergónicas. La hipertermia moderada es usada en el tratamiento de inflamación muscular o articular. La hipertermia alta suele ser invasiva, profunda para los tejidos del cuerpo humano y se aplica con electrodos colocados en puntos precisos del cuerpo, con radiofrecuencia.

El efecto de la hipertermia moderada para el control de algunas infecciones de la piel o vías respiratorias altas es conocido desde hace décadas y a pesar de que, incluso, se han diseñado equipos especializados para su aplicación, aún existen pocos estudios *in vitro* o *ex vivo* de su efecto sobre los microorganismos causales de enfermedad. La leishmaniosis es una de las pocas infecciones en las que se ha reportado el efecto de la temperatura en el tratamiento.

Las especies que conforman el género *Leishmania*, protozoario parásito que constituye el agente etiológico de la leishmaniosis, son termosensibles en el rango de la temperatura fisiológica humana, aunque con diferencias entre ellas, por ejemplo, las especies que ocasionan leishmaniosis visceral, como *L. donovani* y *L. chagasi*, son sensibles a 39 °C, en tanto que las que causan leishmaniosis cutánea, como *L. major*, *L. tropica*, *L. amazonensis* y *L. mexicana*, son sensibles a 37 °C.<sup>4</sup>

La termoterapia local se aplica en pacientes con leishmaniosis cutánea localizada, mediante compresas térmicas con agua caliente, rayos infrarrojos, ultrasonido, electroterapia, radiación con rayo láser de CO<sub>2</sub> y radiofrecuencia. La radiofrecuencia utiliza un equipo con electrodos que descargan 50 °C durante 30 segundos sobre las lesiones. Su uso se ha limitado actualmente debido a que el costo del equipo es alto (alrededor de 20 000 USD) y las refacciones son poco

accesibles, por lo que la reparación no resulta posible en la mayoría de los casos. Además, la radiofrecuencia para tratar lesiones por *Leishmania* se ha asociado a la aparición de lesiones satélites.<sup>5</sup>

Es necesario realizar más estudios preclínicos sobre el efecto de la temperatura en *Leishmania* para entender mejor el fenómeno y establecer bases más precisas para la aplicación de calor con mayor seguridad y eficacia. En el presente estudio se aborda el tiempo que requiere la aplicación de una temperatura fisiológica de 37 °C sobre *L. mexicana*, para eliminar estos parásitos y el mecanismo implicado.

## Métodos

### Parásitos

Se usó una cepa de referencia de *Leishmania mexicana* MNYC/BZ/62/M379 y tres muestras aisladas en Tabasco, México, denominadas MHOM/MX/01/Tab2, MHOM/MX/01/Tab4 y MHOM/MX/01/Tab3: fueron cultivadas a 25 °C en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco, Grand Island, Nueva York, Estados Unidos), con 5 % de suero fetal bovino (FCS, Gibco), con un pase semanal. Los parásitos aislados fueron tipificados por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales e isoenzimas (CIDEIM, Cali, Colombia), que demostraron fenotipo de *L. mexicana*.

### Curvas de crecimiento

Se llevaron a cabo cultivos de parásitos con 24 horas de resiembra, se ajustaron a una densidad de 10<sup>6</sup> parásitos/mL, se homogenizaron con agitación suave y se dividieron en proporciones similares en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> para continuar su incubación a 25, 32 o 37 °C. Cada 24 horas, la densidad de los parásitos se determinó con hematocitómetro a los diferentes tiempos propuestos en la curva de crecimiento. Cada punto se cuantificó por triplicado, a partir de tres diferentes cajas de cultivo, las cuales fueron desechadas después de manipularlas. El número de parásitos se determinó por dos observadores. La forma de los parásitos se identificó con microscopio invertido (Axiovert 40, Göttingen, Alemania).

### Cinética de exposición a 37 °C

Para la obtención de las curvas de crecimiento, las cajas de cultivo fueron incubadas a 37 °C por períodos

de 0 a 72 horas y después fueron regresadas a incubación a 25 °C. Se determinó la densidad cada 24 horas.

### Determinación de apoptosis

Se usó un equipo de detección de apoptosis por anexina V-FITC (Oncogene Research Products, San Diego California, Estados Unidos), el cual fue utilizado conforme a las recomendaciones del productor para identificar apoptosis en los parásitos. Al término de los períodos de incubación definidos en el experimento, el contenido de cada caja de cultivo fue transferido a un tubo de 15 mL, el cual fue centrifugado a 900 g por 10 minutos; los parásitos sedimentados fueron lavados dos veces con tampón fosfato salino con pH de 7.2. Después, los parásitos fueron resuspendidos en amortiguador de enlace y ajustados a  $10^6$  parásitos/mL. Se preparó una mezcla con 1 mL de la suspensión, 5  $\mu$ L de anexina V-FITC y 5  $\mu$ L de yoduro de propidio, que se analizó a los 10 minutos en un citómetro de flujo EPICS-ALTRA (Beckman-Coulter, Fullerton, California, Estados Unidos) y en microscopio de epifluorescencia.

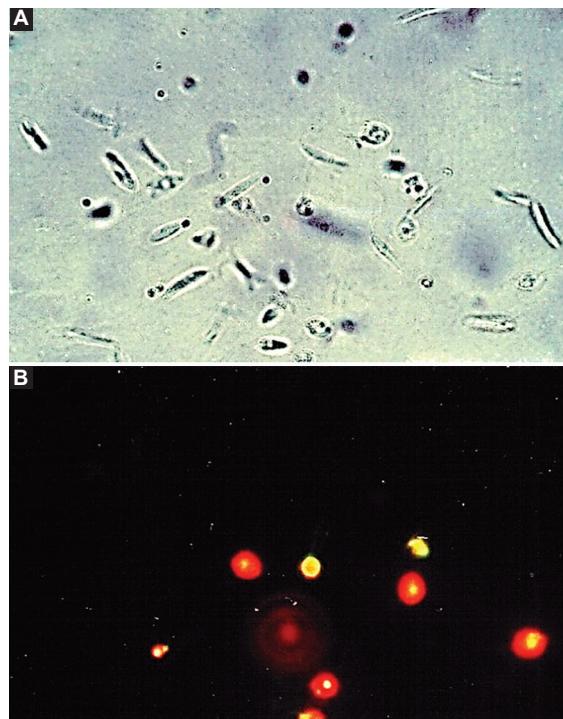
### Tinción con anticuerpos anticiclina

Se utilizaron anticuerpos anticiclinas (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, Estados Unidos): anticiclina A (anticuerpos polyclonales de conejo IgG, 200  $\mu$ g/mL, fluoresceína conjugada, sc-751 FITC), anticiclina B<sub>1</sub> (anticuerpos monoclonales de ratón IgG1, 200  $\mu$ g/mL, sc-245 FITC), anticiclina D<sub>3</sub> (anticuerpos monoclonales de ratón IgG1, 200  $\mu$ g/mL, sc-6283, FITC) y anticiclina E (anticuerpos polyclonales de conejo IgG, 200  $\mu$ g/mL, sc-481 FITC), para teñir parásitos expuestos por 30 minutos a una temperatura de 37 °C. Al término de la incubación se agregaron 5  $\mu$ L de anticuerpo anticiclina por cada 100  $\mu$ L de una suspensión de parásitos  $\times 10^6$ /mL; la mezcla se incubó durante 30 minutos más a 37 °C; se añadió 1  $\mu$ L de yoduro de propidio y se leyó inmediatamente en el microscopio de epifluorescencia. Se usaron parásitos en fase logarítmica o estacionada en cuatro experimentos por separado.

### Resultados

#### Efecto de la temperatura en la forma parasitaria

Las curvas de crecimiento fueron similares a 25 o 32 °C; sin embargo, la forma parasitaria fue diferente. Se observaron promastigotes a 25 °C y formas

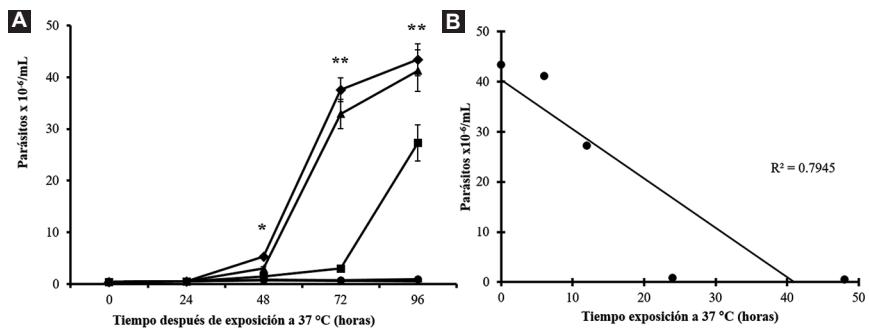


**Figura 1.** Modificaciones estructurales en promastigotes de *Leishmania* incubados a 37 °C. Parásitos de la especie *Leishmania mexicana* cambian su forma al incrementarse la temperatura a 37 °C: se vuelven esféricos y los núcleos se condensan en cuerpos apoptóticos. Fotografía con luz. A: se observan promastigotes, de forma alargada, con flagelo, que no se tiñen con yoduro de propidio; B: los parásitos fluorescentes en rojo son formas esféricas.

parecidas a amastigotes a 32 °C, sin requerimiento de monocitos. Las formas se diferenciaron desde las primeras 24 horas. A 29 °C se observó la coexistencia de ambas formas, promastigotes y amastigotes; la exposición a 37 °C desde cualquiera de las dos temperaturas, 25 o 32 °C, disminuyó la cantidad de parásitos viables y, en su lugar, aparecieron formas esféricas, no refringentes, con núcleos fragmentados, compatibles con la descripción de organismos en apoptosis, que se tiñeron con yoduro de propidio y con anexina V-FITC (Figura 1). En los cultivos en fase logarítmica, la tinción con yoduro de propidio alcanzó hasta 78 %, a diferencia de un máximo de 23 % en los cultivos en fase estacionada. Los resultados fueron similares con cualquiera de las tres cepas de *L. mexicana* descritas.

#### Cinética de exposición a 37 °C

La muerte de los parásitos a 37 °C se probó en una cinética de exposición con regreso de los cultivos a 25 °C. Se observó decremento en el número de parásitos e incremento del tiempo en que comenzó la fase logarítmica. Los



**Figura 2.** Efecto de la temperatura en las curvas de crecimiento. Parásitos de la cepa MNYC/BZ/62/M379 a una densidad inicial de  $0.36 \times 10^6$  parásitos/mL fueron expuestos a 37 °C por ◆ 0 h, ▲ 6 h, ■ 12 h, ● 24 h o menos de 48 h, y regresados a 25 °C. \*p = 0.023, \*\*p < 0.0001, ANOVA. A: la densidad de los parásitos en los cultivos fue determinada cada 24 horas durante 96 horas. B: se presenta la curva de correlación entre el tiempo de exposición a 37 °C con la densidad parasitaria alcanzada a las 96 horas de cultivo, matriz de correlación de Pearson -0.891, con nivel de significación alfa = 0.05.

cultivos expuestos durante 48 horas volvieron a multiplicarse, aunque varios días después que los expuestos durante menor tiempo (Figura 2A). En cambio, la exposición por un periodo muy breve, de 15 minutos, resultó en un incremento del número de parásitos, con curvas de crecimiento que alcanzaron su pico con mayor rapidez que en la muestra control. El número de parásitos en los cultivos revisados 96 horas después de haber sido expuestos a 37 °C fue inversamente proporcional al tiempo de exposición a dicha temperatura (Figura 2B).

### Identificación del ciclo celular en parásitos en apoptosis

Se usaron anticuerpos anticiclinas A, B<sub>1</sub>, D<sub>3</sub> y E marcados con FITC y contratinación con yoduro de propidio para identificar a los parásitos que morían al exponerlos a 37 °C; los parásitos se tiñeron bien con anticuerpos anticiclinas A, D<sub>3</sub> y E, y pobemente con anticiclina B<sub>1</sub>, lo cual confirma que los parásitos que entran en apoptosis por exposición a 37 °C requieren un ciclo celular activo, principalmente en fases S y G<sub>2</sub>. En la tinción con anticuerpo anticiclina E, la mitad de los parásitos se tiñó solo en verde y la otra mitad en verde y rojo, mientras que los parásitos morfológicamente en mitosis no se tiñeron con yoduro de propidio, lo cual indica que en la fase M del ciclo celular no se indujo apoptosis por la exposición a la temperatura de 37 °C (Figura 3).

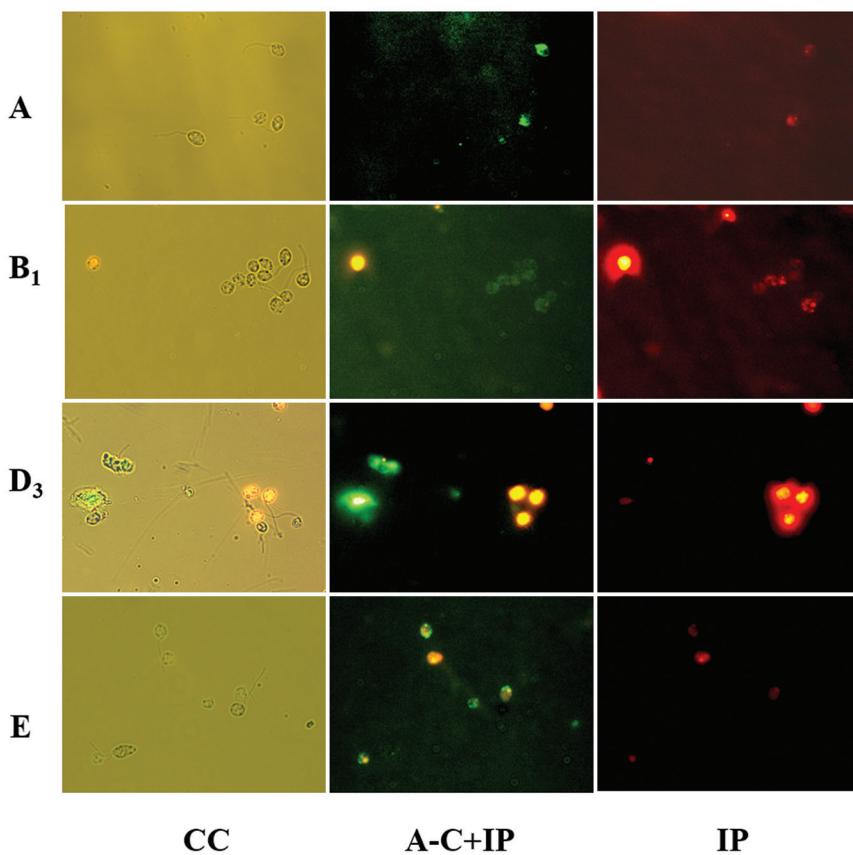
### Discusión

La temperatura de 37 °C, considerada fisiológica para el cuerpo humano, tuvo efecto letal en una

proporción alta de parásitos *L. mexicana* cuando se encontraban en fase logarítmica del cultivo. Varios estudios han informado la inducción de apoptosis por cambios de temperatura,<sup>6-8</sup> generalmente a 39 °C, con expresión de proteínas de choque térmico.<sup>9</sup>

En cultivo *in vitro* no se observó letalidad total en ninguno de los experimentos de estrés térmico, lo que sugiere que una proporción de los parásitos se encontraba arrestada en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de su ciclo celular con alta regulación negativa en la transcripción y traducción de genes, como sucede con los tripanosomátidos. Experimentos recientes muestran que el efecto de la temperatura es directamente sobre la traducción de los genes. De hecho, la regulación de la expresión del genoma de los parásitos tripanosomátidos tiene ciertas particularidades como su genoma policistrónico, lo que significa que se transcriben múltiples genes sobre un solo transcripto de ARNm, que se ve sometido a regulación postranscripcional por cortes trans y poliadenilación.<sup>10</sup>

El efecto del incremento de la temperatura en cultivos de parásitos del género *Leishmania* se asemeja al cambio morfológico de promastigotes a amastigotes cuando el parásito es transmitido del vector hospedero al mamífero y en sentido inverso, cuando pasa de amastigote a promastigote, al ser adquirido por un vector al alimentarse de un hospedero portador. Las bases de esta transformación morfológica involucran proteínas de choque térmico (HSP, *heat shock proteins*), particularmente la HSP de 90 kDa, con 11 sitios susceptibles de fosforilarse diferencialmente, que ejerce un control postranscripcional en dos niveles de los genes del parásito. En el primer lugar, un sitio susceptible de fosforilación en las serinas Ser<sub>289</sub> y



**Figura 3.** Ciclo celular en la inducción de apoptosis por temperatura de 37 °C. Parásitos *Leishmania* en fase logarítmica fueron incubados a 37 °C por 60 minutos y teñidos con anticuerpos anticiclina A (A), anticiclina B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>), anticiclina D<sub>3</sub> (D<sub>3</sub>) y anticiclina E (E). CC: campo claro; A-C: anticuerpo anticiclina; IP: yoduro de propidio. Imagen a escala 100x.

Ser<sub>526</sub> afecta la traducción de genes que conforman el flagelo y el parásito cambia su forma reversiblemente entre amastigote y promastigote. El resto de los sitios de la serina que son susceptibles de fosforilarse son importantes para la supervivencia del parásito, pues su eliminación la hace inviable.<sup>11</sup>

El conjunto de cambios epigenómicos que suceden en *Leishmania* cuando el parásito se expone durante dos horas a una temperatura de 37 °C, incluye cambios en su transcriptoma que involucran a 3969 genes de 10 700 que pueden ser transcritos. Un total de 1866 genes incrementan su traducción, entre ellos los que codifican proteínas asociadas a funciones de adhesión celular y formación de proteasomas. Hay 2103 genes que disminuyen su traducción y las proteínas que codifican están asociadas a unidades de traducción de ARNm, a la biogénesis de ribosomas y al citoesqueleto.<sup>12</sup>

La temperatura también afecta la expresión diferenciada de las formas clínicas de la infección por *L. mexicana*. En las regiones con clima tropical

húmedo y caliente se expresa la clásica inflamación del cojinete plantar de ratones infectados experimentalmente; en los climas fríos y secos, los animales infectados presentan alopecia y lesiones escamosas en las que se encuentran formas de promastigotes en la superficie de la piel.<sup>13</sup>

El efecto de incrementar la temperatura en regiones externas del cuerpo humano incluye cambios que favorecen el mecanismo de presentación de antígenos y la producción de citocinas asociadas a respuestas Th1 y Th17, así como la eliminación de patógenos intracelulares, como *Leishmania*.<sup>14</sup> Además, al inducir apoptosis en el parásito, se contribuye a disminuir la densidad parasitaria en las lesiones y a facilitar la eliminación de los parásitos a través de dos efectos, uno antiparasitario y otro inductor de la respuesta inmune antipatógenos intracelulares.

Considerando que *L. mexicana* es sensible a 37 °C, se propone el uso de una fuente externa que genere calor regional moderado, de 42 °C, como compresas térmicas o cojines eléctricos que generan y mantienen esa

temperatura durante períodos específicos que van de 20 a 90 minutos y cuya aplicación actual es para disminuir la inflamación y favorecer la distensión de lesiones musculares. A partir de los resultados se puede proponer que se apliquen incrementos locales tópicos de 40 a 42 °C, sostenidos por al menos 30 minutos, sobre las lesiones cutáneas causadas por *L. mexicana*, para favorecer la eliminación local del parásito.

La elevación externa de la temperatura a 42 °C es perfectamente tolerable para el organismo humano, que tiende a mantener su temperatura sistémica regular en  $37 \pm 0.5$  °C a través de mecanismos como la sudoración, la vasodilatación y el incremento del flujo sanguíneo, regulados por el hipotálamo.<sup>15</sup> Las personas rescatadas después de 24 a 48 horas de exposición ambiental a 42 °C han presentado un incremento de apenas un grado de su temperatura sistémica.<sup>16</sup> Con la aplicación de aditamentos generadores de calor controlado de 42 °C en forma tópica por menos de 90 minutos no se genera el riesgo de un incremento significativo de la temperatura sistémica. Un incremento regional en el sitio de aplicación puede permear a las zonas cercanas por el mecanismo de convección a razón de 40 a 38 °C, en un gradiente de temperatura que se disipa gradualmente hasta los 37 °C en el tejido circundante. Este incremento en la temperatura sería suficiente para inducir apoptosis en parásitos de la superficie de la piel, al tiempo que se favorece su eliminación a través de la inducción de respuestas Th1 locales.

Los habitantes de zonas endémicas de leishmaniosis usan diversas infusiones administradas en paños calientes sobre las lesiones cutáneas como medida tradicional para eliminar las lesiones, pero no se controla la temperatura, ni el tiempo en que se sostiene.

## Conclusiones

La aplicación de temperatura controlada, en límites fisiológicos de 39 a 42 °C y por un periodo mayor a 30 minutos, puede inducir la muerte de *Leishmania mexicana* a través de la apoptosis de parásitos metabólicamente activos.

## Financiamiento

Para la investigación descrita en este artículo, se recibió financiamiento del sistema de Investigación SIGOLFO, clave 00-02-006-T.

## Conflictos de intereses

La autora declara que no existe conflicto de intereses.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** La autora declara que para esta investigación no se realizaron experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** La autora declara que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** La autora declara que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

## Bibliografía

- Hurwitz MD. Hyperthermia and immunotherapy: clinical opportunities. *Int J Hyperthermia*. 2019;36:4-9.
- Umar D, Das A, Gupta S, Chattopadhyay S, Sarkar D, Mirji G, et al. Febrile temperature change modulates CD4 T cell differentiation via a TRPV channel-regulated Notch-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117:22357-22366.
- Wang X, Ni L, Wan S, Zhao X, Ding X, Dejean A, et al. Febrile temperature critically controls the differentiation and pathogenicity of T helper 17 cells. *Immunity*. 2020;52:328-341.e5.
- Callahan HL, Portal IF, Bensinger SJ, Grogl M. Leishmania spp: temperature sensitivity of promastigotes in vitro as a model for tropism in vivo. *Exp Parasitol*. 1996;84:400-409.
- Siadat AH, Iraji F, Zolfaghari A, Shariat S, Jazi SB. Heat therapy for cutaneous leishmaniasis: a literature review. *J Res Med Sci*. 2021;26:15.
- Moreira ME, Del Portillo HA, Milder R V, Balanco JMF, Barcinski MA. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism Leishmania (Leishmania) amazonensis. *J Cell Physiol*. 1996;167:305-313.
- Basmaciyan L, Azas N, Casanova M. Different apoptosis pathways in Leishmania parasites. *Cell Death Discov*. 2018;4:4-7.
- Raina P, Kaur S. Chronic heat-shock treatment driven differentiation induces apoptosis in Leishmania donovani. *Mol Cell Biochem*. 2006;289:83-90.
- Brandau S, Dresel A, Clos J. High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus Leishmania. *Biochem J*. 1995;310:225-232.
- Clayton C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. *Open Biol*. 2019;9:190072.
- Hombach-Barrigah A, Bartsch K, Smirlis D, Rosenqvist H, MacDonald A, Dingli F, et al. Leishmania donovani 90 kD heat shock protein – impact of phosphosites on parasite fitness, infectivity and casein kinase affinity. *Sci Rep*. 2019;9:5074.
- Rastrojo A, Corvo L, Lombraña R, Solana JC, Aguado B, Requena JM. Analysis by RNA-seq of transcriptomic changes elicited by heat shock in Leishmania major. *Sci Rep*. 2019;9:1-19.
- Quiñonez-Díaz L, Mancilla-Ramírez J, Ávila-García M, Ortiz-Ávalos J, Berrón A, González S, et al. Effect of ambient temperature on the clinical manifestations of experimental diffuse cutaneous leishmaniasis in a rodent model. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012;12(10):851-860.
- Mancilla-Galindo J, Galindo-Sevilla N. Exploring the rationale for thermotherapy in COVID-19. *Int J Hyperthermia*. 2021;38:202-212.
- Wright WF, Auwaerter PG. Fever and fever of unknown origin: review, recent advances, and lingering dogma. *Open Forum Infect Dis*. 2020;7:1-12.
- Meade RD, Akerman AP, Notley SR, McGinn R, Poirier P, Gosselin P, et al. Physiological factors characterizing heat-vulnerable older adults: a narrative review. *Environ Int*. 2020;144:105909.