



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



IMUNOTERAPIA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Maria das Graças de Oliveira Brito

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,
SIBI - UFBA.

B862 Brito, Maria das Graças de Oliveira
Imunoterapia na leishmaniose cutânea. / Maria das Graças
de Oliveira Brito. – Salvador, 2012.
86 f.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Lima Machado

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Imunoterapia. 3. TNF- α . 4.
Pentoxifilina. 5. Quimiocinas. I. Machado, Paulo Roberto
Lima. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.993.161



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



IMUNOTERAPIA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Maria das Graças de Oliveira Brito

Professor-orientador: Paulo Roberto Lima Machado

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.

Salvador (Bahia), 2012



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



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IMUNOTERAPIA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dr. Heitor Gonçalves – Doutor em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará

Dra. Jussamara Brito – Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia

Dr. Lucas Carvalho – Doutor em Patologia Humana pela Universidade Federal da Bahia

FRONTISPÍCIO

“...Morre lentamente quem não vira a mesa quando está infeliz com seu trabalho ou amor, quem não arrisca o certo pelo incerto para ir atrás de um sonho, quem não permite, pelo menos uma vez na vida, fugir dos conselhos sensatos....”

Pablo Neruda

DEDICATÓRIA

À minha mãe, pela dedicação incondicional a mim e a minha filha; que me estimulou, acreditou nos meus sonhos e me ajudou sempre a torná-los reais.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Paulo Roberto Lima Machado pela confiança, paciência e ensinamentos ao longo deste período.
- Ao Dr. Edgar Marcelino pelo apoio fundamental na realização deste trabalho.
- A minha filha, pelo abraço e sorriso cada vez que retornava para casa, parecendo entender o que acontecia e me estimulando sempre.
- A Mayra Dourado, presente em todos os momentos deste trabalho; agradeço a dedicação e o companheirismo.
- A Luiz Henrique Guimarães e a Adriano Queiroz – pela colaboração sempre constante.
- A Clara Passos pela finalização do estudo e por sua ajuda sempre disponível.
- A equipe do Posto de Saúde de Corte de Pedra: impossível a realização sem seu trabalho e colaboração.
- Aos pacientes, que consentiram e confiaram no nosso projeto.
- Aos meus amigos, pelo incentivo e carinho.
- A Deus e Nossa Senhora das Graças, acima de todos os agradecimentos, pela proteção nas estradas e na realização dos procedimentos; pela permissão na concretização de mais um sonho e pelo amor presente.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Universidade Federal da Bahia

- Serviço de Imunologia (SIM)

FONTES DE FINANCIAMENTO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Bolsa de Estudo da Capes

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (CNPq/MCT)

ÍNDICE

Índice de Quadros e Tabelas	12
Índice de Figuras e Gráficos.....	13
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	14
I – RESUMO	16
II – OBJETIVOS.....	18
III – INTRODUÇÃO	19
IV - REVISÃO DE LITERATURA	21
IV.1 – Introdução	21
IV.2 – Fisiopatologia.....	22
IV.2.1 - Resposta Th1	23
IV.2.2 - Papel do TNF- α na resposta Th1	24
IV.2.3 - Efeitos do TNF- α	25
IV.2.4 - Resposta inflamatória tecidual na LC.....	25
IV.2.5 - Leishmaniose mucosa e leishmaniose disseminada.....	27
IV.2.6 - Formas clínicas atípicas.....	28
IV.3 – Diagnóstico	29
IV.4 – Tratamento	30
IV.4.1 - Resistência à terapia com Antimonial Pentavalente.....	31
IV.4.2 – Imunoterapia	33
IV.4.3 – Pentoxifilina.....	34
V - CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	36
V.1 - Modelo do estudo.....	36
V.2 - População do estudo e randomização	36
V.3 - Critérios de inclusão	36
V.4 - Critérios de exclusão.....	37
V.5 - Administração dos tratamentos do estudo	38

	11
V.6 – Acompanhamento.....	39
V.7 - Critério de cura.....	39
V.8 - Critério de falha terapêutica.....	39
V.9 - Procedimento em caso de falha terapêutica.....	40
V.10 - Critério para retirada do estudo e considerações de segurança	40
V.11 - Análise clínicas laboratorias	41
V.12 – Avaliação da produção de citocinas e quimiocinas	41
V.13 – Análise estatística.....	42
V.14 – Considerações éticas	42
VI – RESULTADOS.....	44
VII – DISCUSSÃO	50
VIII - PERSPECTIVAS DO ESTUDO	52
IX – CONCLUSÕES	53
X – SUMMARY	54
XI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
XII – ARTIGO SUBMETIDO.....	66
XIII – ANEXOS.....	80
1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	80
2. Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa.....	84
3. Escala CTCAE	86

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

Tabela I: Perfil de infecção em humanos. Principais quimiocinas, receptores de quimiocinas e seus efeitos biológicos em leishmaniose. Oghumu, 2010. (**Página – 26**)

Tabela 1: Dados epidemiológicos e clínicos dos pacientes com LC tratados com a associação de pentoxifilina e Sb^v (grupo de estudo) ou com placebo e Sb^v (grupo controle). (**Página – 45**)

ÍNDICE DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura I: Resposta Imune na leishmaniose cutânea. Oghumu, 2010.

(**Página – 23**)

Figura II: Mecanismos de resistência à droga. Ouellette, 2004.

(**Página – 32**)

Figura 1. 1A. Níveis de TNF- α em culturas de PBMC de pacientes com LC tratados com Sb^v e placebo (N=9) ou Sb^v e Pentoxifilina (N=8) no dia 0 e 15 de tratamento. 1B. Supressão da produção de TNF- α medidos em sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico cultivadas com antígeno solúvel de *leishmania* por 72 h pela técnica ELISA. **(PG 46)**

Figura 2: Níveis de CCL-3 de pacientes com LC tratados com Sb^v associado a placebo (N=9) ou Sb^v e pentoxifilina (N=8) no dia 0 e dia 15. **(PG 47)**

Figura 3. Níveis de CXCL-9 (figura 3A) e CXCL-10 (figura 3B) de pacientes com LC tratados com Sb^v e placebo (N=9) ou Sb^v associado a pentoxifilina (N=8) no dia 0 e dia 15 com tratamento, medidos de sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico cultivadas com SLA por 72 h, pela técnica ELISA. **(PG 48)**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CCL-2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CCL-3	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3</i>
CXCL-9	<i>C-X-C motif chemokine 9</i>
CXCL-10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i>
CCCL-11	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 11</i>
CCR-2	<i>C-C chemokine receptor type 2</i>
CCR-3	<i>C-C chemokine receptor type 3</i>
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
HIV	Vírus de Imunodeficiência Humana
HAART	Terapia antiretroviral
ICAM-1	Moléculas de adesão em células endoteliais
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-27	Interleucina 27
LC	Leishmaniose Cutânea
LD	Leishmaniose Disseminada
LM	Leishmaniose Mucosa

LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MHC-II	Complexo Maior de Histocompatibilidade classe II
NK	<i>Natural killer</i>
NO	Óxido Nítrico
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PDE IV	Fosfodiesterase IV
RNA	Ácido Ribonucléico
Sb ^v	Antimonial pentavalente
TCD4, TCD8	Antígenos de superfície
Th1,Th2	Célula T <i>helper</i> do tipo 1,2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNF-I	Receptor de TNF- α em células endoteliais
TNF-II	Receptor de TNF- α em células linfóides
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
RNA	Ácido ribonucléico

I. RESUMO

IMUNOTERAPIA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Introdução: A leishmaniose cutânea (LC) é uma endemia em expansão. Tem-se mostrado que a resposta imune inflamatória é fundamental na gênese das ulcerações: (1) Intenso infiltrado inflamatório na lesão, com poucos parasitas, (2) produção elevada de IFN- γ e TNF- α *in situ*, (3) correlação direta entre quantidade de linfócitos ativados e tamanho da úlcera, (4) tratamento com antimonial na fase pré-ulcerativa não impede o aparecimento da úlcera. Estes dados sustentam a necessidade de se associar ao tratamento específico, medicamentos que modulem a resposta imune. A pentoxifilina surge como potencial terapêutico por inibir a produção de TNF- α , citocina pró-inflamatória. **Objetivo:** Avaliar em um ensaio clínico controlado de fase III a influência da pentoxifilina associada ao antimonial na resposta imune em pacientes com leishmaniose cutânea. **Metodologia:** Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, placebo controlado de 17 pacientes com LC atendidos no posto de saúde de Corte de Pedra (BA). Todos confirmados por PCR ou cultura. Incluídos pacientes apresentando de 1 a 3 lesões ulceradas com 1 a 3 meses de evolução, entre 18 e 65 anos. Todos foram tratados com antimonial pentavalente (Sb^V) (20mg/Kg/dia por via intravenosa) associado com placebo ou pentoxifilina (400mg - 3 vezes ao dia) por 20 dias. A cura foi definida por critério clínico: cicatrização total das lesões 60 dias após término do tratamento.

As concentrações de TNF- α , CCL-3, CXCL-9 e CXCL-10 foram determinadas em sobrenadantes de culturas de células mononucleares estimulada com antígeno de *Leishmania* pela técnica de Elisa. **Resultados:** Falha terapêutica foi observada em 14% dos pacientes tratados com a associação e em 45% do grupo controle ($p = 0,05$). Os valores de TNF- α ,

CCL-3, CXCL-9 e CXCL-10 foram mensurados antes e quinze dias (D15) após início de tratamento. Em ambos os grupos houve diminuição de CCL-3 e TNF- α e aumento dos níveis de CXCL-9 e CXCL-10 no D15. No entanto, a queda dos níveis de TNF- α foi maior no grupo da pentoxifilina ($p = 0,004$). **Conclusão:** Associação com a pentoxifilina aumentou a taxa de cura da LC, associado a inibição na produção de TNF- α . **Palavras-chave:** 1. Leishmaniose Cutânea; 2. Imunoterapia ; 3. TNF- α ; 4. Pentoxifilina; 5. Quimiocinas.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar em um ensaio clínico controlado de fase III a influência da pentoxifilina associada ao antimonial na resposta imune em pacientes com leishmaniose cutânea.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar a eficácia da associação pentoxifilina e antimonial com o tratamento convencional da leishmaniose cutânea;
2. Caracterizar e comparar a resposta imune dos pacientes em uso da associação e dos pacientes no grupo controle, através da dosagem de TNF- α , CCL-3, CXCL-9 e CXCL-10 no sangue periférico.

III. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é doença endêmica, que apresenta distribuição mundial com uma incidência anual de 1 a 1,5 milhões de caso (Desjeux et al., 1992). Aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* podem levar às formas tegumentar e visceral. Os principais agentes da leishmaniose cutânea no novo mundo são *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis panamensis*, *L. mexicana amazonensis*, *L. mexicana mexicana* (Desjeux et al., 1992; Lainson et al., 1983) . Formas clássicas de leishmaniose tegumentar americana (LTA) são a cutânea, disseminada, difusa e mucosa (Jones et al., 1987).

O protozoário infecta e se prolifera em macrófagos, desencadeando uma ativação da resposta Th1 – mediada pelos linfócitos CD4. Essas células produzem IFN- γ , ativando os macrófagos. Na ausência desta resposta, ocorre a leishmaniose cutâneo difusa (LCD) – onde se observam múltiplas lesões nodulares com macrófagos cheios de parasitas (Sher et al., 1992). A leishmaniose cutânea (LC) é caracterizada por úlcera única ou múltipla com borda bem delimitada e aspecto granulomatoso. Estudos sugerem um desequilíbrio da resposta imune nas formas cutânea e mucosa, conduzindo a uma exacerbação da resposta inflamatória e conseqüentemente, o dano tecidual (Faria et al., 2005).

As lesões são caracterizadas por: (1) Infiltrado inflamatório rico e com poucos parasitas (Faria et al., 2005), (2) IFN- γ e TNF- α em concentrações altas nas células mononucleares do sangue periférico e no tecido (Bacellar et al., 2002) , (3) células T CD4+ e T CD8 freqüentes nas lesões (Faria et al., 2005), (4) há correlação entre citocinas inflamatórias e tamanho da úlcera (Antonelli et al., 2005) , (5) IFN- γ e TNF- α decrescem após terapia e cura da doença (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998), (6) tratamento precoce com antimonial antes da formação da úlcera é

associado a alto índice de falha, sugerindo-se a estreita relação da resposta inflamatória ao aparecimento da úlcera (Machado et al., 2002).

Portanto, estes dados indicam que a resposta imune exacerbada e com predomínio do componente inflamatório são fundamentais na patogênese da doença. Drogas que modulam esta resposta imune, quando associadas ao antimônio, diminuem o tempo de doença (Machado et al., 2007).

CXCL-9 (*C-X-C motif chemokine 9*) e CXCL-10 (*C-X-C motif chemokine 10*) são fundamentais na resposta imune inata. Essas quimiocinas tem afinidade por células que expressam receptores CXCR-3, como as CD4+, CD8+, células NK, macrófagos e células dendríticas (Oghumu et al., 2010). CXCL-9, induzida por IFN- γ , induz quimio-atração de células T e a CXCL-10 – secretada por várias linhagens celulares em resposta ao IFN- γ (Teixeira et al., 2006).

A quimiocina CCL-3 ou *Chemokine (C-C motif) ligand 3* é responsável pelo recrutamento e ativação de polimorfonucleares em estados inflamatórios agudos; atrai macrófagos e poucas células CD4+ em lesões de leishmaniose cutânea disseminada (LD) (Oghumu et al., 2010).

O tratamento da LTA ainda é um desafio. O Sb^v usado isoladamente está associado a 10 a 40% de falha terapêutica na forma cutânea clássica (O’Neal et al., 2007) . A pentoxifilina associada ao antimonial acelera o tempo de cura em leishmaniose mucosa (LM) e também nas formas cutâneas (Machado et al., 2007). Esta droga bloqueia a transcrição de TNF- α pelo RNA-m dos macrófagos, diminuindo a expressão da molécula de adesão intracelular (ICAM-1) in vivo e in vitro (Neuner et al., 1997).

Nosso trabalho estuda, através de um ensaio clínico, a relação entre a resposta imune e a resposta terapêutica em pacientes tratados com antimonial isoladamente ou associado à pentoxifilina.

IV - REVISÃO DE LITERATURA

IV.1 - Introdução

A leishmaniose é uma das seis mais importantes doenças, no grupo de doenças tropicais, pela Organização Mundial de Saúde. Apresenta uma alta incidência – média de 1,5 milhões de pessoas/ano (Desjeux et al., 1992). O seu agente etiológico é o parasito do gênero *Leishmania*. É uma doença espectral, em alguns casos auto resolutive, mas desfigurante. O espectro varia de formas assintomáticas e sub-clínicas a formas cutâneas, mucosas, cutâneo-mucosas, disseminadas (definida por mais de dez lesões papulares e/ou acneiformes e/ou ulceradas em pelo menos duas partes do corpo) até a forma visceral. Desnutrição, deficiência de ferro e sexo masculino tem sido associados às formas mais severas (Machado-Coelho et al., 2005). A maioria dos pacientes com LC (90%) são procedentes do Iran, Afeganistão, Paquistão, Síria, Arábia Saudita, Peru e Brasil (Murray et al., 2005). Aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* são mais envolvidas na doença. Os principais agentes da leishmaniose cutânea no Novo Mundo são *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis panamensis*, *L. mexicana amazonensis*, *L. mexicana mexicana* (Desjeux et al., 1992; Lainson et al., 1983).

IV.2 – Fisiopatologia

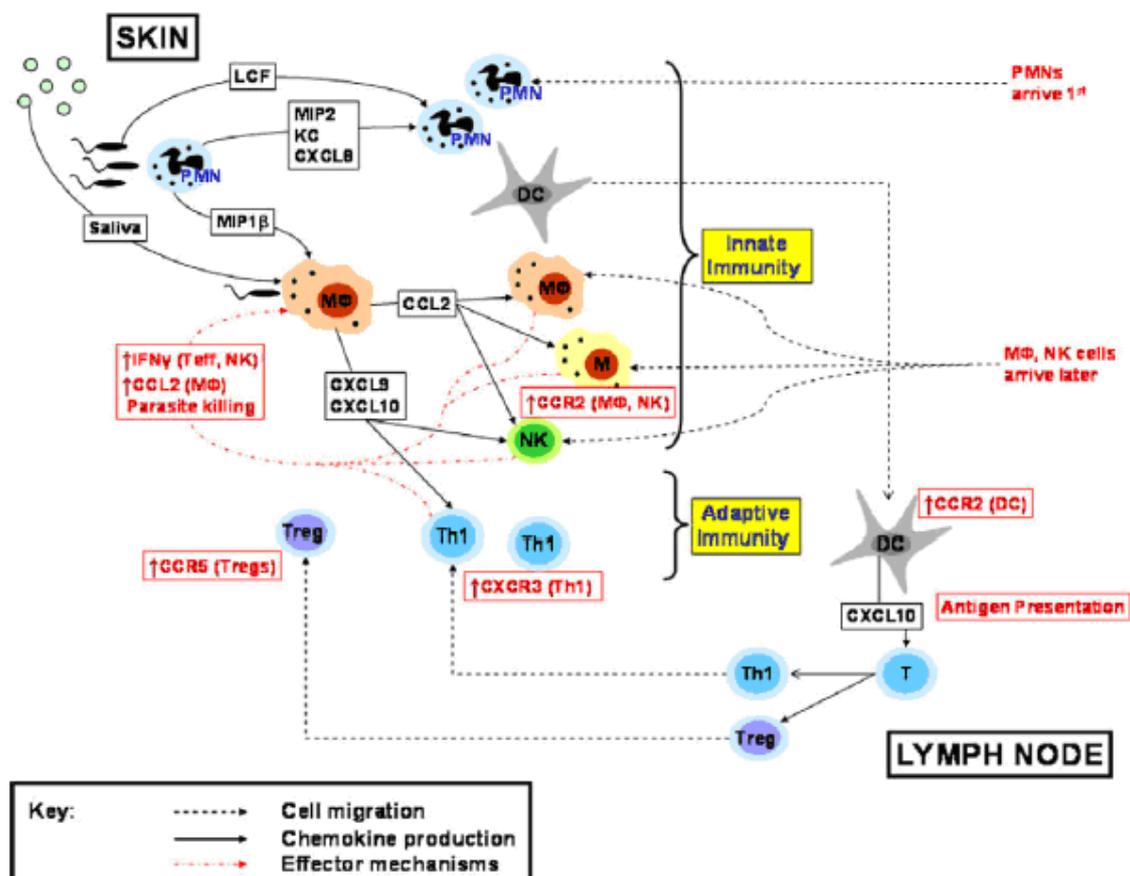
O agente da leishmaniose é transmitido através da picada de flebotomíneo fêmea do gênero *Lutzomia*. É um parasito intracelular obrigatório, invade macrófagos e células dendríticas; que foram atraídas pela saliva do inseto após a picada, onde se prolifera.

Essas células captam o parasita, migram para o linfonodo, transformando-se em células dendríticas maduras e o apresentam para as células T. Adicionalmente, essas células apresentadoras de antígeno são também fonte de IL-12, citocina crucial para a indução da resposta Th1 (Ritter et al., 2002).

As células Th1 são atraídas para o sítio da infecção, produzindo CCL-2, que por sua vez ativa as células NK, produzindo grande quantidade de IFN- γ . A CCL-2 e o IFN- γ agem sinergicamente, ativando macrófagos e, portanto, interferindo com a resposta de imunidade inata. Receptores de CCL-2 (CCR-2) estão presentes nas superfícies de células dendríticas; no entanto, na LD estão ausentes ou diminuídos (Ritter et al., 2002). Altas concentrações de CCL-2 estão presentes na LC e diminuídos na LCD. Como mecanismo de defesa, na superfície do parasito, o glicolípido mais abundante de sua superfície – o lipofosfoglican (LPG) – inibe a produção de CCL-2 pelas células endoteliais – dificultando o seu trânsito (Oghumu et al., 2010).

Na condução das fases iniciais da resposta imune o papel das quimiocinas e seus receptores é crucial, colaborando com a evolução para as diferentes formas clínicas descritas na LTA. Assim, enquanto na LC localizada existe uma resposta Th1 predominante, na LCD a resposta Th2 é dominante (Oghumu et al., 2010; Coler et al., 2005).

Figura I: Resposta Imune na leishmaniose cutânea



Fonte: Oghumu, *et al.*, 2010

IV.2.1 - Resposta Th1

A IL-12 e o IFN- γ coordenam a resposta Th1 com o recrutamento de células efetoras: CD4⁺, CD8⁺, macrófagos e células NK. As células T produtoras de IFN- γ e IL-2 são denominadas Th1, ativando macrófagos com atividade citotóxica (Heinzel et al., 1991). Essas interleucinas têm ação fundamental na eliminação dos parasitas: o IFN- γ é relacionado à produção de óxido nítrico e intermediários do nitrogênio.

A resolução da LC localizada é determinada pela aquisição da resposta imune celular (Th1). A intensidade desta resposta depende das linfocinas produzidas por linfócitos, macrófagos e queratinócitos. O desequilíbrio nesta produção resulta na úlcera (Pirmez et al., 1993).

IL-1 beta (β) e TNF- α estão presentes em todas as manifestações tegumentares da leishmaniose. O TNF- α é produzido por monócitos / macrófagos ativados em resposta a produtos de membrana que se ligam a receptores toll-like, sendo também produzido por células NK.

IL-6 e GM-CSF, produzido pelos macrófagos, estão presentes em metade dos pacientes com leishmaniose tegumentar. Assim como o TNF- α e a IL-1 beta (β), todas essas citocinas se apresentam em níveis elevados na LC, LM e na intradermoreação de Montenegro (Pirmez et al., 1993).

IV.2.2 - Papel do TNF - α na resposta Th1:

O TNF- α participa do dano tecidual em inflamações crônicas, doenças infecciosas e auto-imunes. É uma citocina pró-inflamatória que divide com a IL-1 atividades biológicas importantes: Ativação endotelial, indução de febre e estimulação de síntese de proteínas de fase aguda. Participa também do choque séptico; apresenta ação no crescimento de células tumorais e na síndrome consumptiva (Kollias et al., 1999; Martin et al., 2003).

A transcrição do TNF- α é controlada por fatores nucleares: $\kappa\beta$ e NF- $\kappa\beta$. O TNF- α age através de sua ligação com receptores específicos de membrana: TNF-I e TNF-II. A distribuição desses receptores em diferentes células coordena as diversas ações desta citocina: As epiteliais expressam TNF-I e as linfóides, TNF-II. O TNF- α age sobre o crescimento, diferenciação e apoptose de células imunes e não imunes; age nas respostas

agudas às infecções e no restabelecimento da homeostase (Kassiotis et al., 2001).

O TNF- α é determinante na inflamação e seus instrumentos na injúria imunológica são os eicosanóides, prostaglandinas, proteases e leucotrienos (Blam et al., 2001).

IV. 2.3 - Efeitos do TNF- α :

- Aumenta a expressão do complexo maior de histocompatibilidade classe II (MHC-II) (Blam et al., 2001).

- Ativa a expressão de moléculas de adesão ICAM-1 em células endoteliais, envolvidas no trânsito de células entre sangue e tecido (Kassiotis et al., 2001; Witkamp et al., 2000).

- Aumenta secreção celular de citocinas (Blam et al., 2001).

- Depleta glutathiona celular (antioxidante potente) (Witkamp et al., 2000).

- Induz secreção de metaloproteinases e óxido nítrico (NO), levando à morte celular. (Kollias et al., 1999 ; Witkamp et al., 2000).

- Potencializa a apoptose e a citotoxicidade (Kollias et al., 1999; Witkamp et al., 2000).

IV.2.4 - Resposta inflamatória tecidual na LC

As quimiocinas são divididas em 02 grupos: CXC – onde as 02 primeiras cisteínas são separadas por 01 aminoácido e o grupo – CC, onde as cisteínas são vizinhas. A LC e LD diferem não só em severidade e curso,

mas também pelo perfil de quimiocinas e pela composição de células inflamatórias no soro e no sítio da infecção.

A resposta Th1, orquestrada pela IL-12 e pelo IFN- γ recruta macrófagos, células NK, CD4+ e CD8+ para o sítio da infecção (Heinzel et al., 1991). Em lesões auto-resolutivas, que predominantemente se apresentam como úlceras clássicas, CCL-2, CXCL-9 e CXCL-10 estão associadas ao infiltrado dérmico composto de macrófagos e células CD4+ (Ritter et al., 2002). CXCL-9 e CXCL-10 são fundamentais na resposta imune inata. Essas quimiocinas têm afinidade por células que expressam receptores CCR-3, como as CD4+, CD8+, células NK, macrófagos e células dendríticas (Oghumu et al., 2010). CXCL-10 aumenta a citotoxicidade das células NK, representando ação protetora na LC. CCL-2 e CCL-3 tem atividade anti-leishmaniótica. Em LD a expressão de CCL-2 é diminuída.

O parasito pode, seletivamente, inibir a produção de CXCL -10 por parte dos neutrófilos, adquirindo resistência (Oghumu et al., 2010).

Tabela I: Perfil de infecção em humanos. Principais quimiocinas, receptores de quimiocinas e seus efeitos biológicos na leishmaniose.

Chemokine	Parasite	Biological effect
CCL2	<i>L. mexicana</i>	Attract macrophages to CL ² lesions Ritter and Korner (2002)
CXCL9,10	<i>L. mexicana</i>	Attract CD4 ⁺ cells (Th1) to CL ² lesions Ritter and Korner (2002)
CCL3	<i>L. mexicana</i>	Attract macrophages and few CD4 ⁺ cells (Th2) to DCL ² lesions Ritter and Korner (2002)
CCL7	<i>L. major</i>	Attract Th2 cells to lesion site Katzman and Fowell (2008)
CXCL8	<i>L. major</i>	Attract neutrophils to lesion Badolato et al. (1996); Venuprasad et al. (2002)
CCL2	<i>L. major</i>	Attract T cells, NK cells, induce anti-leishmanial activity in Macs Romao et al. (2009)
CCR2	<i>L. major</i>	Migration of DCs to lymph node and T cell areas of spleen Sato et al. (2000)
CCL5	<i>L. major</i>	Contributes to resistance to parasite Santiago et al. (2004)
CCR5	<i>L. major</i>	Treg migration to dermal sites and parasite persistence Yurchenko et al. (2006)
CCL4	<i>L. major</i>	Attract macrophages to lesion site van Zandbergen et al. (2004)
CXCL9, 10	<i>L. amazonensis</i>	Attract CD8 ⁺ , CD4 ⁺ T cells, macrophages and dendritic cells Vasquez et al. (2008)
CXCL10	<i>L. major</i>	Attracts Th1 cells and activates them to release IFN- γ Zaph and Scott (2003)
CXCR3	<i>L. major</i>	Th1 migration to skin lesions Rosas et al. (2005)
CCL2	<i>L. infantum</i>	Induction of Th2 cells and parasite persistence in the spleen Rousseau et al. (2001)
MIP1 α	<i>L. donovani</i>	Attract monocytes to liver Cotterell et al. (1999)
CXCL10	<i>L. donovani</i>	Attract CD4 ⁺ and CD8 ⁺ cells and prolonged expression contributes to granuloma formation and parasite elimination in liver Cotterell et al. (1999)
CCL19, 21	<i>L. donovani</i>	Downregulation inhibits dendritic cell migration to PALS Engwerda et al. (2002)
CCR7	<i>L. donovani</i>	Downregulation in DCs impairs migration to T cell areas of spleen Ato et al. (2002)
CCR5	<i>L. donovani</i>	Enhances susceptibility to infection Sato et al. (1999); Bhattacharyya et al. (2008)

Fonte: Oghumu et al., 2010.

Existe uma correlação entre diâmetro da lesão na LC e frequência de produção de citocinas inflamatórias (Antonelli et al., 2005); TNF- α e IFN- γ diminuem no sítio da infecção após terapia e cura (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998); o tratamento precoce da leishmaniose antes do aparecimento da úlcera clássica, associa-se a altos índices de falha terapêutica - sugerindo que o processo inflamatório é fundamental no aparecimento da úlcera (Machado et al., 2002; Unger et al., 2009). Em lesões de 15 a 30 dias, foi evidenciado que a intensidade do processo inflamatório é proporcional ao número de TCD8+ que expressam granzima A (molécula citotóxica) e que a resposta citotóxica antes do aparecimento da úlcera está associada à expressão de TIA-1 e a vasculite granulomatosa, obliterando o lúmen dos vasos (Machado et al., 2002).

Na LC o rico infiltrado inflamatório, contrasta com a pobreza de parasitos (Faria et al., 2005; Bittencourt et al., 2001), no entanto a cicatrização das lesões não garante a cura parasitológica já que a presença do parasito foi descrita em cicatrizes 8 anos após o tratamento e cura clínica (D'utra-e-Silva, 1915).

IV. 2.5 - Leishmaniose mucosa e leishmaniose disseminada:

Na LM existe uma associação da resposta imune celular (Th1) e humoral (Th2). A IL-4, IL-10 e a IL-13 são marcadores da resposta humoral. Os níveis de IL-4 são elevados na LM, diminuindo a resposta celular mediada (Pirmez et al., 1993). Há diminuição de IFN- γ , equivalência de níveis de TNF- α em relação à LC e diminuição significativa da IL-10. A relação IFN- γ / IL-10 é maior que na LC; em virtude da queda acentuada dessa citocina na LM – o que gera: inibição da produção de intermediários do nitrogênio por macrófagos ativados, aumento da produção de IL-12 e TNF- α (resposta Th1), sinergia com TGF-

β (inibindo a atividade microbicida) e desvio Th2 (co-estimulada por moléculas apresentadoras de antígeno). Em LC a IL-10 tem ação protetora (Salhi et al., 2008). Na LM o número de receptores de IL-10 está diminuído, o que explica a exacerbação local da resposta inflamatória mediada pela alta produção de IFN- γ e TNF- α (Faria et al., 2005).

IL-10 e IL-27 diminuem os níveis de TNF- α em cultura de indivíduos sadios PPD estimulados, mas na prática clínica a oferta dessas interleucinas não favorece a diminuição de TNF- α e IFN- γ .

CCL-2 é diminuído na LD em relação à LC. Não houve diferenças entre os níveis de IFN- γ , TNF- α e TGF- β ; assim com de CCL-2, CCL-3, CCL-11 e CCL-10 comparando-se lesões papulares e ulceradas na LD com as úlceras clássicas da LC (Carvalho et al., 2007).

Mostrou-se também que na LD há uma menor produção de TNF- α no sangue periférico em relação à LC e LM, porém os níveis desta citocina se encontram mais altos nos pacientes que possuem doença mucosa associada, o que indica o papel patogênico do TNF- α na lesão mucosa (Carvalho et al., 2007).

IV.2.6 - Formas clínicas atípicas

Manifestações atípicas da LC podem ser verrucosas, vegetativas, crostosas ou lupóides. Equivalem a aproximadamente 2,5% dos casos, acometem predominantemente homens e em região da face (Guimarães et al., 2008). Co-infecção com HIV está presente em menos de 6% dos casos (Machado et al., 2010). Reativação da infecção ou exacerbação é o habitual. Lesões viscerais ocorrem quando níveis de CD4 encontram inferiores a 200mg /dl; síndrome de reconstituição inflamatória tem sido descrita após utilização da terapia anti-retroviral (HAART) (Chrusciak-Talhari et al., 2009). Outras enfermidades que cursam com

imunossupressão como diabetes, desnutrição, tuberculose, radioterapia e transplantes evoluem de forma similar (Weigle et al., 1996).

Gravidez é um importante fator de risco para leishmaniose atípica. Um estudo retrospectivo de Morgan et al. (2007) mostrou que lesões em grávidas são maiores que as controle: lesões exofíticas ocorrem em 42% dos casos e doença disseminada em 11,5%. Nascimento pré-termo (11,5%) e natimortos (10,5%) foram relatados.

IV. 3 – Diagnóstico

Os métodos diagnósticos podem ser subdivididos em:

Diretos: Cultura: O material da base da úlcera é rico e a combinação de microscopia e cultura aumenta a sensibilidade diagnóstica em até 85%.

PCR: Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction) é um método de amplificação (de criação de múltiplas cópias) de DNA (ácido desoxirribonucleico) sem o uso de um organismo vivo. A cultura ou análise de DNA permite a identificação precisa da espécie. A detecção do parasito por técnica de PCR é sensível para o diagnóstico de LM e LC, no entanto, cultura e PCR são técnicas laboratoriais de difícil execução (Murray et al., 2005).

Indiretos: Sorologia: Anticorpos anti-leishmania séricos podem ser detectados através de testes padronizados e sensíveis, mas na prática o diagnóstico é realizado através da identificação microscópica do parasito em biopsias ou esfregaços (Murray et al., 2005).

Intradermoreação de Montenegro (IDRM): Consiste em uma reação de hipersensibilidade retardada, mensurável através da presença de inflamação, eritema ou mesmo erupção cutânea características, induzidas em uma dada região da pele do paciente após a injeção intradérmica de uma solução salina metiolada contendo antígenos

inoperantes ou partes destes previamente preparados por processo de lise celular, liofilização e/ou outros (Mayrink et al., 1989).

IV. 4 - Tratamento

A droga de primeira escolha é o Sb^V , existente sob duas formas: o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime) e o estibogluconato de sódio (Pentostam) - para padronização do esquema terapêutico a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que seja calculado em $mg/Sb^V/kg/dia$ (Gontijo et al., 2003). O seu mecanismo de ação é desconhecido, acredita-se tenha ação no macrófago do hospedeiro (Croft et al., 2003). Os efeitos colaterais mais freqüentes são artralgia, mialgia, inapetência, cefaléia, febre, vômitos, tontura e inchaço no local da aplicação. A cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade limitam sua segurança (Gontijo et al., 2003). Abortivos, não devem ser administrados em gestantes.

A Anfotericina B, antifúngico da classe dos polienos, produzido por cultura de actinomicetos *Streptomyces nodosus* uma bactéria filamentosa. Com ação leishmanicida, é a droga de segunda escolha empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial ou na impossibilidade de seu uso. Age alterando a membrana celular do parasito, gerando um desequilíbrio iônico (Croft et al., 2003). Anfotericina B tem índice de cura maior que o antimonial na LM (Amato et al., 2007).

A Pentamidina é um medicamento que age no DNA do cinetoplasto do parasito, de fácil aplicação, porém custo alto. Os seus resultados são inferiores ao Sb^V , conforme revisão sistemática (González et al., 2009).

A Paramomicina é um aminoglicosídeo e age nas bactérias na unidade 30S do ribossomo – inibindo a síntese de RNA. Na leishmaniose age também na mitocôndria do parasito. A associação Paramomicina +

Antimonial é altamente efetiva, com cura em 95% dos casos (El-On et al., 2009).

A Miltefosina é uma droga usada inicialmente como agente antitumoral e posteriormente no tratamento da Leishmaniose Visceral na Índia (Sundar et al., 2012), surgindo como opção terapêutica de maior praticidade por ser administrada por via oral. Seu mecanismo de ação se dá por interferência nos sinais de transdução e na síntese de fosfatidilcolina (Amato et al., 2007). Os estudos na LC mostram resultados diversos, dependendo do país e da espécie de *Leishmania* (Soto et al., 2008; Vélez et al., 2010; Machado & Penna 2011). No entanto, em dois ensaios clínicos brasileiros, houve superioridade da Miltefosina em comparação ao Sb^v (Machado et al. 2010, Chrusciak-Talhari et al. 2011). Esses resultados não foram mantidos em crianças, sendo atribuído este fato à dificuldade de ingestão dos comprimidos e pela biodisponibilidade da droga em crianças (Machado et al., 2010).

IV. 4.1 - Resistência à terapia com Sb^v:

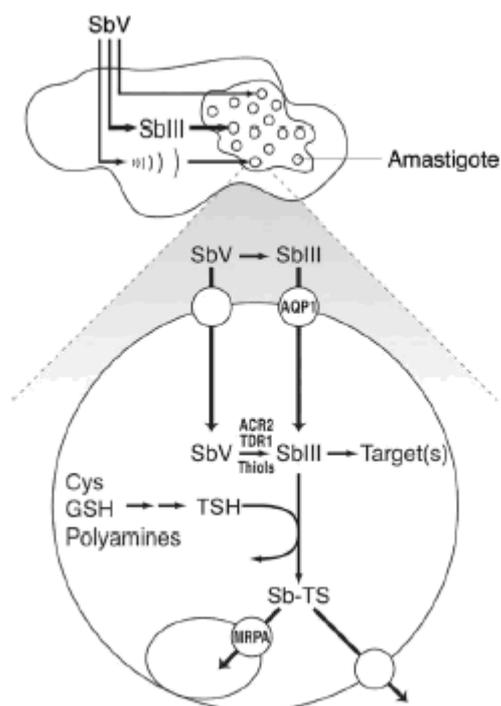
A seleção de *Leishmania* resistente à terapia com antimonial tem mecanismo desconhecido. Bases multifatoriais da resposta terapêutica têm obscurecido a relação susceptibilidade à droga e resposta clínica. Fatores como: imunidade do hospedeiro, fatores farmacológicos, manufatura e lote da droga, susceptibilidade das diferentes espécies de *Leishmania* influenciam nessa relação. Em geral, a resistência ao Sb^v é adquirida durante o tratamento (Rojas et al., 2006) e varia de 10 a 40% dos casos (O'Neal et al., 2007).

A ação do antimonial no amastigota é através de transporte desconhecido ou pela aquaglicerporina (AQP1). No parasito, a droga (Sb^v) pode ser convertida a Sb^v III por thiols ou por redutases ACR2 ou TRD1.

Sb^V III provavelmente interage com algum alvo celular, formando conjugados com vários thiols- como a cisteína, glutatona e tripanotiona.

Não se conhece onde a formação desses conjugados é enzimaticamente mediada ou não. Em casos de resistência, os níveis de tripanotiona estão elevados (Ouellette et al., 2004).

Figura II: Mecanismos de resistência à droga



Fonte: Ouellette et al., 2004

IV. 4.2 - Imunoterapia:

Em virtude do alto índice de falha terapêutica, do curso prolongado e do desenvolvimento de espécies resistentes tem-se buscado opções terapêuticas associadas ao tratamento padrão com Sb^v.

Os imunomoduladores se destacam nesse arsenal, desde que a leishmaniose se mostra uma enfermidade essencialmente imuno-mediada.

Estudos com Imiquimode tem sido realizados há mais de uma década. Esta droga ativa os receptores *toll like* (7 e 8) presentes na superfície de células apresentadoras de antígeno, aumentando a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-1e IL-12 : estimulando macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO), favorecendo a morte do parasito pela indução da resposta Th1. Pode também ativar diretamente o macrófago infestado com a forma amastigota. No entanto, de forma isolada, o Imiquimode pode reduzir o tamanho da lesão, mas não cura. Associado à Paramomicina ou Miltefosina atinge índices de cura de até 80% (Miranda-Verastegui et al., 2009).

O GM-CSF pode acelerar a cura por 03 possíveis mecanismos: ativação de macrófagos, estímulo da cicatrização e modulação imunológica. O seu uso associado ao Sb^v reduz a dose e o tempo de tratamento e, conseqüentemente, sua toxicidade (Almeida et al.,1999).

As vacinas participam das opções terapêuticas. Ensaio clínico composta por forma promastigota de cadeia isolada de *L. amazonensis* foi realizado em 2002; e mostrou-se útil nos casos não responsivos a SB^v isoladamente, com HIV ou que apresentassem LD. Parece induzir resposta Th1 pelo aumento de IFN- γ . A cura foi obtida associando-a ao Sb^v (com dose reduzida em 50%) (Machado-Pinto et al., 2002).

Evidenciou-se que a LC em pacientes co-infectados com helmintos demorava mais em curar (O'Neal et al.,2007). Os helmintos modulam a

resposta imune, modificando o curso clínico de doenças como asma e doença de Crohn. Estão relacionados à indução de IL-10, a qual modifica a resposta Th1 em direção à Th2. No entanto, a terapia anti-helmíntica associada ao Sb^v não acelerou a cura da LC (Newlove et al., 2011).

Finalmente, o entendimento de que uma resposta imune inflamatória e exacerbada é importante na patogênese da LC e que o TNF- α desempenha um papel importante nesse contexto, abriu perspectiva para o uso da pentoxifilina como nova opção na imunoterapia associada ao tratamento da LC.

IV. 4.3 - Pentoxifilina

A pentoxifilina é uma metilxantina que inibe a fosfodiesteras IV (PDE IV), o que impede a degradação de AMP-cíclico (AMP-c) e prostanóides, aumentando a concentração intracelular de AMP-c em células pró-inflamatórias e do sistema imune (Eigler et al., 1997).

O aumento do AMP-c regula negativamente a expressão dos fatores de transcrição NF-kB e NF-AT. A inibição desses fatores contribui no bloqueio da síntese de TNF- α , por inibir a mensagem de transcrição RNA-m de macrófagos; diminuindo também *in vivo* e *in vitro* a expressão de moléculas de adesão intra-celular 1 (ICAM-1) em monócitos (Neuner et al., 1997).

A pentoxifilina tem ação hemorreológica, favorecendo a flexibilidade de hemácias; facilitando o trânsito através de capilares e promovendo também a degranulação de plaquetas (Blam et al., 1996). Esta droga tem sido usada em doenças inflamatórias e infecciosas como: SARA (Síndrome de Angústia Respiratória Aguda) (Martin et al., 2003) ; osteomielite (Blam et al., 1996); mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) (Shirabe et al., 1997) , LM e LC (Machado et al., 2007).

A convicção de que a leishmaniose é associada à resposta imune intensa e com componentes pró-inflamatórios desbalanceados; fortalece o uso de imunomoduladores que tenham o TNF- α como alvo de modulação.

Em todos os estudos acima referidos, a dose de pentoxifilina variou de 300 a 1200mg/dia e não houveram efeitos tóxicos relevantes.

V - CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

V.1 – Modelo do estudo

Ensaio clínico controlado, duplo-cego, randomizado de fase III, comparando a associação de pentoxifilina com antimonial pentavalente (grupo de estudo) e placebo associado ao antimonial pentavalente (grupo controle) no tratamento da LC.

V.2- População do estudo e randomização

O estudo tem como base a população do posto de saúde de Corte de Pedra, no município de Tancredo Neves (BA), área de transmissão de *L. braziliensis*. Os pacientes tiveram o diagnóstico de LC confirmado por critério clínico (presença de úlcera clássica) e critérios laboratoriais: PCR ou positividade da cultura para *Leishmania* ou intradermoreação de Montenegro. Foram incluídos os pacientes que concordem em participar do estudo, mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Anexo I.

Os pacientes foram alocados em 2 grupos: 10 pacientes no grupo de estudo (pentoxifilina com antimonial pentavalente) e 10 pacientes no grupo controle (placebo com antimonial pentavalente).

V. 3 – Critérios de Inclusão

- Leishmaniose cutânea ulcerada, não tratada e diagnóstico laboratorial obtido com pelo menos um dos

seguintes exames: PCR ou cultura para *leishmania* positivo(a), intradermoreação de Montenegro positiva;

- Idade: 18 a 65 anos;
- Sexo: masculino e feminino elegíveis;
- Presença de no mínimo 1 lesão ulcerada, em qualquer localização;
- Presença de no máximo 3 lesões ulceradas;
- Diâmetro das lesões variando entre 1 e 5 cm;
- Evolução clínica da doença não inferior a 1 mês e não superior a 3 meses

V.4 – Critérios de exclusão

Preocupações de segurança:

- Evidência de doença subjacente grave (cardíaca, renal, hepática, pulmonar) ou maligna;
- Pacientes com imunodeficiência ou anticorpo para HIV;
- Desnutrição protéica e/ou calórica grave;
- Qualquer doença infecto-contagiosa, não-controlada
- Mulheres grávidas ou lactentes;
- Alergia ao antimoniato ou à pentoxifilina.

Falta de adequabilidade para este estudo:

- Tratamento anterior para leishmaniose;
- Pacientes LC sem lesão (ões) ulcerada(s);

Razões administrativas:

Incapacidade ou negação em assinar o consentimento informado (paciente e/ou pais/representante legal); não disponibilidade para as visitas ou para os procedimentos do estudo.

V.5- Administração dos tratamentos do estudo

Antimoniato de meglumina – ampolas com 5ml contendo 81mg de antimônio pentavalente (Sb^V) por ml: dose de 20mg/kg/dia por 20 dias, administrado por via endovenosa (sem necessidade de diluição).

- Pentoxifilina – cápsulas contendo 400mg de pentoxifilina, deglutidas após as três principais refeições, durante 20 dias em paralelo ao uso do antimoniato de meglumina.
- Placebo – cápsulas contendo placebo serão deglutidos após as três principais refeições, durante 20 dias, em paralelo ao uso do antimoniato de meglumina.

V.6 - Acompanhamento:

- Os pacientes serão avaliados clínico-laboratorialmente antes de iniciar o tratamento e 15 dias após o mesmo;
- Avaliação clínica mensal nos 3 primeiros meses após o tratamento, sendo a última avaliação clínica 1 ano após o início da terapêutica;
- Os pacientes deverão devolver as ampolas de Sb^v e as cartelas de pentoxifilina ou placebo a cada visita (usadas e não usadas), devendo-se fazer uma anamnese dirigida para detectar uso irregular da medicação.

V.7 – Critério de cura

Cicatrização total da(s) lesão (ões), sessenta dias após o início do tratamento.

V.8 – Critério de falha terapêutica

- Persistência da ulceração ou infiltração na borda da lesão, 90 dias após o início da terapêutica;
- Recidiva da doença ou aparecimento de lesão mucosa após o início do tratamento, em acompanhamento de até 1 ano;

- Efeito colateral importante ou alergia às drogas utilizadas que impliquem na interrupção do tratamento.

V.9 – Procedimento em caso de falha terapêutica

- Nos pacientes considerados falha terapêutica, uma nova série de antimonial será fornecida, com igual dose, por 20 dias. A persistência de atividade indicará tratamento com Anfotericina B.
- Pacientes que apresentarem infecções associadas será feito uso de antibiótico sistêmico por sete a dez dias.

V.10 - Critérios para retirada do estudo e considerações de segurança

- Intolerância ao esquema terapêutico - efeitos colaterais moderados ou severos que impeçam a continuidade do esquema terapêutico. Os moderados são sinais ou sintomas que necessitem suspensão temporária do tratamento. Os severos não mantêm a medicação, incluindo alterações da função renal, hepática ou cardíaca, manifestadas clinicamente.
- Falha na administração de três doses consecutivas ou necessidade de mais de 30 dias para realização do tratamento;
- Solicitação expressa do paciente para se retirar do estudo.

- O investigador deverá perguntar ao paciente em cada visita, se ele/ela apresentou ou não qualquer problema médico incomum.
- Todos os eventos adversos que ocorrerem durante o tratamento do estudo devem ser documentados, independentemente da suposição de uma relação causal, na página respectiva da ficha clínica (CRF). A documentação de eventos adversos inclui data de início e término, e gravidade de acordo com a escala CTCAE (Trotti, 2003). O investigador também deverá avaliar a probabilidade de uma relação causal do evento adverso com a medicação do estudo como provável, não avaliável, ou improvável.

V.11 Análises clínicas laboratoriais

De cada paciente foi coletado uma amostra de 20 ml de sangue venoso periférico, para a realização de testes laboratoriais, antes e 15 dias após o início do tratamento, e compreenderão os seguintes parâmetros:

Hematologia: leucócitos, hemoglobina, plaquetas

Substratos: creatinina, uréia

Enzimas: SGOT/AST, SGPT/ALT

Gravidez: Beta-hCG; presença ou ausência; em mulheres que possam engravidar.

V.12 Avaliação da produção de citocinas e quimiocinas

Células mononucleares do sangue periférico foram obtidas de 20 mililitros de sangue venoso heparinizado, por centrifugação, usando o

gradiente de separação ficoll-hypaque (Organon Teknika, Durnham, NC, USA). Após lavadas em solução salina, foram suspensas em RPMI 1640 (Gibco, Gran Island NY) suplementado com 10% de soro inativado AB⁺ e antibióticos. As células foram ajustadas para a concentração de 10^7 /ml e alíquotas de 0,1ml (10^6 células foram encubadas em placas de 24 poços a 37° C com 5% de CO₂ com ou sem adição de antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) na concentração 5µg/ml. Após 72h, sobrenadantes foram coletados e TNF-α, CCL3, CXCL-9 e CXCL-10 foram mensurados pela técnica ELISA usando reagentes R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Os resultados foram expressos em pg/ml. O antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) foi preparado a partir de cepa isolada de paciente com LM (Reed et al., 1986).

V.13 – Análise estatística

A comparação entre a resposta imunológica dos dois grupos placebo e pentoxifilina foi realizada pelo teste pareado de Wilcoxon. O teste não paramétrico foi escolhido considerando-se que a amostra não respeitava uma distribuição Gaussiana. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando o valor de p foi maior que 0,05.

V.14 – Considerações éticas

Este estudo foi elaborado segundo as diretrizes éticas internacionais para pesquisas Biomédicas envolvendo seres humanos (Resolução 196/96 CNS, 1996), e foi submetido a julgamento pela Comissão de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira da Universidade Federal da Bahia.

Antes do ingresso na pesquisa, os pacientes forneceram o consentimento voluntário após informação, por escrito, o qual consta de todas as informações sobre a pesquisa, incluindo exames e tratamentos a que serão submetidos, além da garantia de que continuarão a receber devida assistência médica caso se recusem a fazer parte do estudo ou que dele quiserem se retirar (ANEXO I).

VI – RESULTADOS

Os pacientes que receberam Sb^V associado a placebo ou à pentoxifilina não diferiram nas características clínico-epidemiológicas de base (tabela 1). Não houve diferenças entre os grupos baseando-se em sexo, idade, número de lesões ou tamanho das lesões. Dos 20 pacientes incluídos, 03 não compareceram na visita do 15º dia para coleta de sangue e dosagem de citocinas e quimiocinas na 2ª avaliação imunológica, sendo excluídos do estudo.

Falência terapêutica foi observada em 14% dos pacientes que receberam Sb^V associado a pentoxifilina. No grupo controle, 45% dos pacientes não foram curados após 60 dias de tratamento. O tempo de cura foi maior neste grupo ($P < 0,05$).

Os níveis de CCL-3 em ambos os grupos são mostrados na figura 1. Houve diminuição importante nos níveis de CCL-3 nos pacientes do grupo da pentoxifilina após terapia. Nos demais essa diminuição foi discreta.

Tabela 1: Dados epidemiológicos e clínicos dos pacientes com LC tratados com a associação de pentoxifilina e Sb^v (grupo de estudo) ou com placebo e Sb^v (grupo controle).

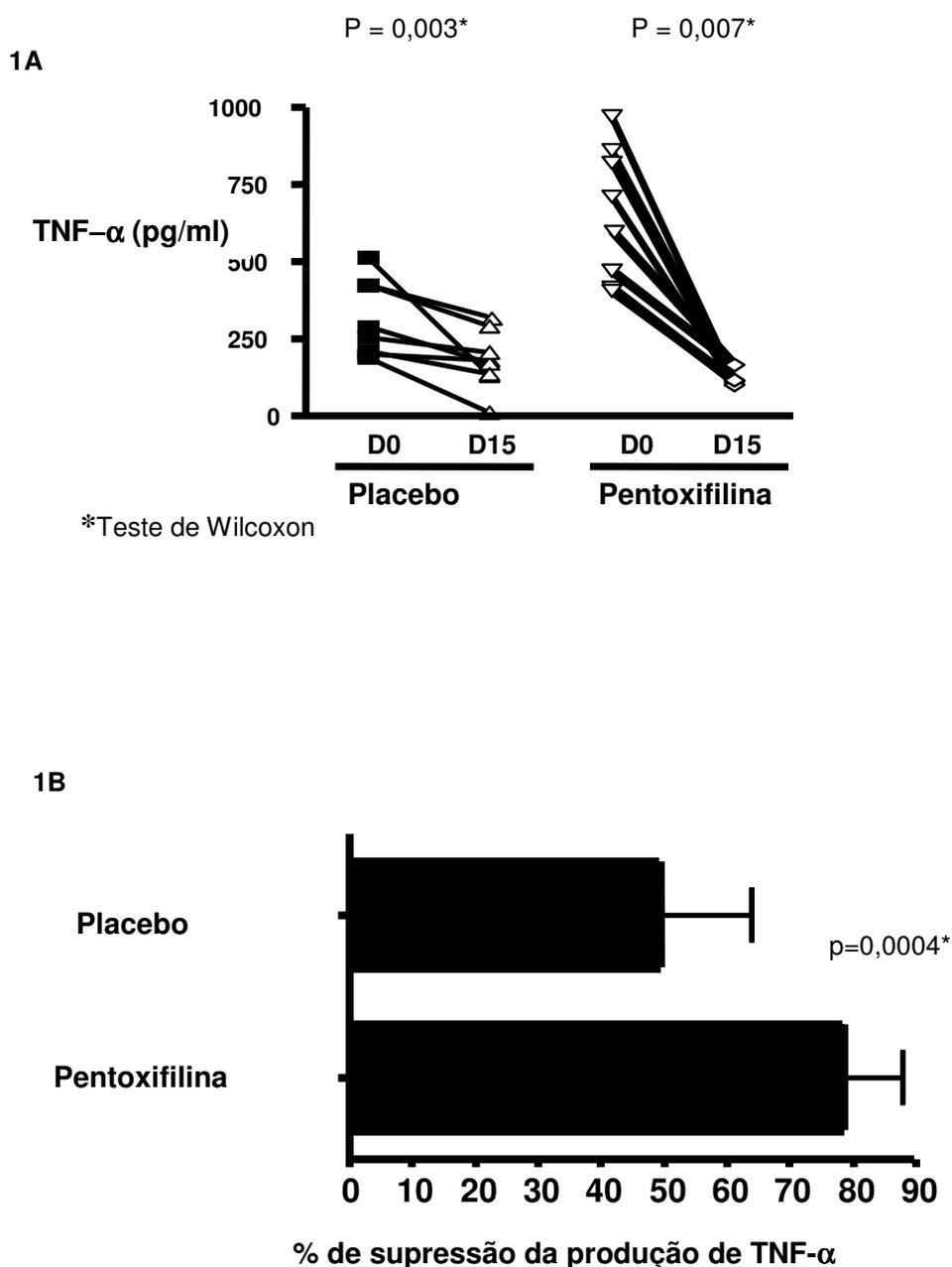
	Sb ^v	Sb ^v +Pentoxifilin a	Valor de P#
Sexo masculino (%)	77	86	0,10
Idade (M ± DP)*	30 ± 10	28 ± 5	0,64
Falha terapêutica (%)	45	14	0,05
Número de lesões (M±DP)	1 ± 0	1,7 ± 0,5	0,11
Tamanho das lesões (mm) (M±DP)	25x22	25x19	0,12
Tempo de cura (dias) (M±DP)	103±22	81±4	0,18

* M representa a Mediana e DP o desvio padrão

Teste não-paramétrico de Mann-Whitney

As concentrações de TNF- α antes e depois da terapia estão evidenciadas na Figura 1. No grupo Pentoxifilina a média de TNF- α foi de 660 pg/ml; variando de 320 a 1000 pg/ml. Após a terapia, a média caiu para 150 pg/ml, oscilando os níveis entre 80 e 150 pg/ml (P = 0,007). No grupo placebo a média de TNF- α antes da terapia foi 370 pg/ml, variando entre 510 e 230 pg/ml, caindo após a terapêutica para 150 pg/ml, com taxas entre 0 a 300 pg/ml (P = 0,003). Enquanto a percentagem de supressão de TNF- α no grupo placebo foi 48%, nos pacientes que receberam a pentoxifilina a supressão foi de 79% (P = 0,0004).

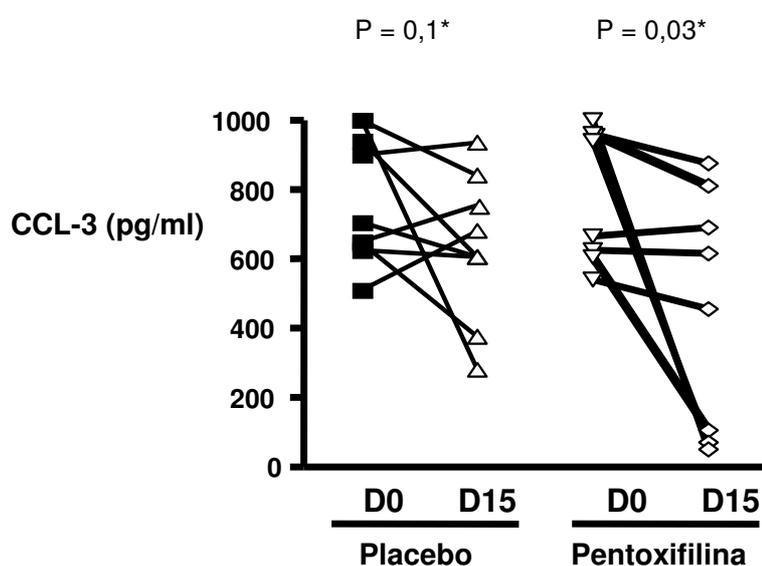
Figura 1. 1A. Níveis de TNF- α em culturas de PBMC de pacientes com LC tratados com Sb^v e placebo (N=9) ou Sb^v e Pentoxifilina (N=8) no dia 0 e 15 de tratamento. **1B.** Supressão da produção de TNF- α medidos em sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico cultivadas com antígeno solúvel de *leishmania* por 72 h pela técnica ELISA.



* Teste de Mann-Whitney

Os níveis de CCL-3 também diminuíram no D15 de tratamento, principalmente no grupo de pacientes que foi tratado com a associação de Sb^v e pentoxifilina (figura 2). No grupo controle também houve queda na produção de CCL-3, porém menos pronunciada e não significativa (figura 2).

Figura 2: Níveis de CCL-3 de pacientes com LC tratados com Sb^v associado a placebo (N=9) ou Sb^v e pentoxifilina (N=8) no dia 0 e dia 15.

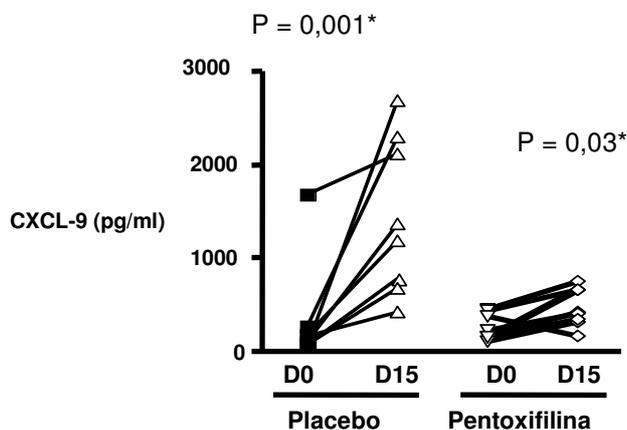


*Teste de Wilcoxon

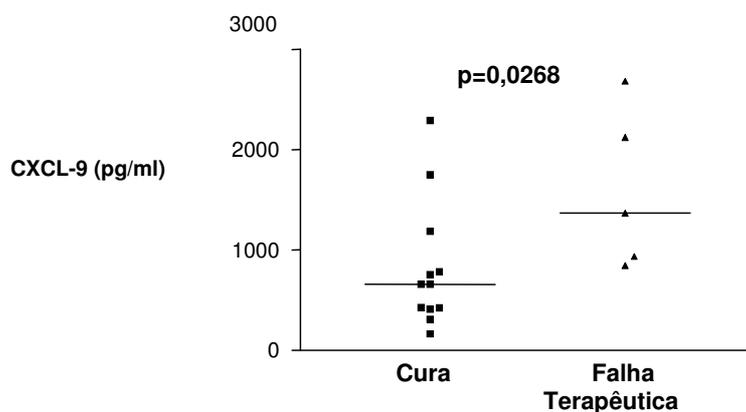
Os níveis médios de CXCL-9 antes da terapia no grupo estudo foi 110 pg/ml, variando de 210 pg/ml a 10 pg/ml (Figura 3). Após o tratamento houve elevação para 405 pg/ml, variando entre 800 pg/ml a 10 pg/ml (P=0,001). No grupo controle as variações entre as médias foram modestas: 173 pg/ml a 369 pg/ml (P = 0,03). Os níveis de CXCL-10 no grupo pentoxifilina foram: 250 pg /ml antes da terapia e 338 pg/ml após terapia (P = 0,009). No grupo placebo, 128 pg/ml antes da terapia e 453 pg/ml após terapia (P = 0,072).

Figura 3. Níveis de CXCL-9 (**figura 3A**) e CXCL-10 (**figura 3B**) de pacientes com LC tratados com Sb^V e placebo (N=9) ou Sb^V associado a pentoxifilina (N=8) no dia 0 e dia 15 com tratamento, medidos de sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico cultivadas com SLA por 72h, pela técnica ELISA.

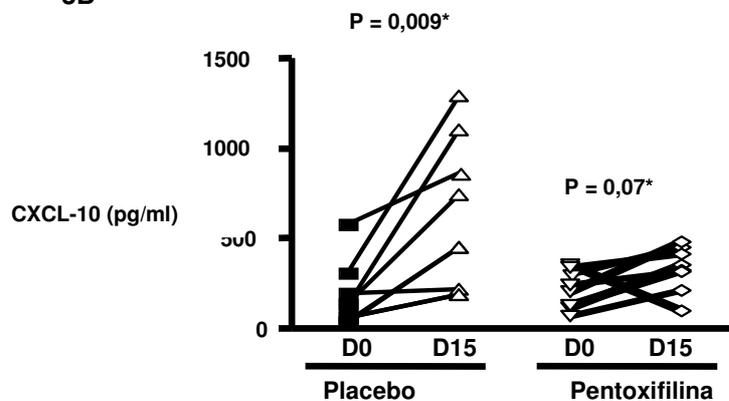
3A



*Teste de Wilcoxon



3B



*Teste de Wilcoxon

Embora um aumento de CXCL-9 e CXCL-10 tenha sido verificado durante o tratamento, este dado foi mais marcante com a quimiocina CXCL-9, que mostrou uma maior elevação nos pacientes que evoluíram com falha terapêutica (Figura 3B).

VII – DISCUSSÃO

Nosso estudo mostra que a associação de pentoxifilina com Sb^v se associa a uma maior taxa de cura da LC (86%) quando comparada a 55% de cura no grupo Sb^v e placebo. A diferença na taxa de cura foi significativa apesar do número pequeno de pacientes incluídos. A eficácia da associação de pentoxifilina ao Sb^v tem sido descrita em formas refratárias de LM (Lessa et al., 2001), e também em estudo controlado no tratamento inicial da LM onde o grupo tratado com pentoxifilina + Sb^v teve 82% de cura comparado a 41,6% no grupo controle (Machado et al., 2007). Adicionalmente, estudo realizado no Irã em pacientes com LC causada por *L. major* também demonstra uma maior taxa de cura em pacientes tratados com pentoxifilina+ Sb^v (Sadeghian et al., 2006).

A diminuição de TNF- α após terapia e cura da LC foi descrita por autores como Da Cruz et al. em 1999 e Ribeiro-de-Jesus et al. em 1998. Em nosso trabalho, a queda nos níveis de TNF- α após o tratamento foi documentada nos grupos controle e experimental (pentoxifilina associada a Sb^v). No entanto, a supressão da produção de TNF- α foi mais intensa no grupo pentoxifilina (P = 0,0004), o que confirma a ação inibidora da produção de TNF- α pela pentoxifilina.

A queda na produção de TNF- α se acompanhou de uma menor produção de CCL-3 durante o tratamento nos dois grupos, sendo mais acentuada no grupo tratado com pentoxifilina. Embora CCL-3 esteja associada com produção de IFN- γ e proteção (Brandonísio et al., 2002), este dado sugere que esta quimiocina também possa estar envolvida com a patogênese da LC e seja inibida pela ação da pentoxifilina.

Assim como o TNF- α , as quimiocinas CXCL-9 e CXCL-10 também podem participar da indução do dano tecidual na leishmaniose, neste caso, através do recrutamento de células T ativadas para o território

cutâneo (Ritter et al., 2002). Além da LC, CXCL-9 e CXCL-10 mostram-se com níveis elevados em doenças imunologicamente mediadas do sistema nervoso central, como a coréia de Sydenham e paraparesia espástica tropical ou mielopatia (HAM/TSP) (Narikawa et al., 2005), o que reforça a hipótese de que estas quimiocinas tenham ação patogênica.

Nos pacientes que evoluíram com falha terapêutica, foi documentado um aumento dos níveis de CXCL-9 e CXCL-10 no D15 de tratamento, principalmente no grupo que não utilizou a associação pentoxifilina-Sbv. A quimiocina que apresentou elevação marcante e significativamente associada com falha terapêutica foi a CXCL-9, o que é coerente com o entendimento de que a sua produção tecidual se associa a injúria e patogênese. Adicionalmente, este dado indica uma potencial aplicação da medida da produção de CXCL-9 como marcador da resposta terapêutica na LC.

VIII – PERSPECTIVAS DE ESTUDO

1. Avaliar a correlação entre os níveis de quimiocinas (notadamente CXCL-9) e a resposta terapêutica, através da realização de um estudo de coorte. Os dados deste estudo podem ter aplicabilidade para definir marcadores biológicos de prognóstico na LC.

2. Aumentar o número de pacientes avaliados através de ensaio clínico randomizado e controlado, comparando a associação pentoxifilina e Sbv com o placebo e Sbv. A possível confirmação do benefício desta associação poderá ter impacto no tratamento convencional da LC.

IX – CONCLUSÕES

1. Este ensaio clínico, randomizado, placebo-controlado demonstrou que a pentoxifilina associada ao Sb^v aumenta significativamente a taxa de cura da LC.

2. O uso da pentoxifilina se associa à redução significativa de TNF- α e CCL-3 indicando papel patogênico destas substâncias.

3. O aumento nos níveis de CXCL-9 mais pronunciado nos pacientes com falha terapêutica sugere que a mensuração desta quimiocina pode ser usada como marcador de prognóstico.

X – SUMMARY

Background. Patients with CL are able to develop a cellular immune response against leishmania, with local and peripheral production of Th1 cytokines. An inhibitor of TNF- α (pentoxifylline) combined with Sb^v modifies this immune response. The aim of this study was to associated changes in the immunological response with therapeutic response in CL.

Methods. In this randomized double blind clinical trial patients were treated with antimony (20mg kg/weight for 20 days) plus pentoxifylline (N=8) or antimony plus placebo (N=9). TNF- α and chemokine levels were measured by ELISA in supernatants of mononuclear cells culture stimulated with soluble *leishmania* antigen for 72 hours. **Results.** While therapeutic failure was only observed in 1 (14%) out 8 patients who received pentoxifylline, failure was observed in 4 (44%) of 9 patients treated with antimony plus placebo (P=0.05). There was a significant decrease in TNF- α after therapy in the 2 groups. Levels of CCL-3 decreased at less extension and the reduction was only significant in patients who received pentoxifylline. Levels of CXCL-9 and CXCL-10 were higher in patients who received only antimony than in patients treated with pentoxifylline. Moreover levels of CXCL-9 were higher in patients who fail to therapy. **Conclusions.** Therapy with pentoxifylline reduces the inflammatory response observed during therapy with antimony for CL and chemokine levels may be considered as a marker for therapeutic response in CL.

XI – REFERÊNCIAS

1. Almeida R, D'Oliveira Jr. A, Machado P, Bacellar O, Ko AI, Mobashery N, Santos JB and Carvalho EM. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 1999;180:1735–7.
2. Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC and Neto VA. Treatment of Mucosal Leishmaniasis in Latin America: Systematic Review. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 77(2), 2007, pp. 266–274.
3. Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol*, May 2004;136(2):341-8.
4. Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* , Aug 2005;2.
5. Bafica A, Oliveira F, Freitas LA, Nascimento EG, Barral A. American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. *Int J Dermatol*, Mar 2003;42(3):203-7.
6. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro De Jesus A, Dutra WO, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*. 2002;70(12):6734-4.

7. Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991;86(1):51-6.

8. Blam ME, Stein RB, Lichtenstein GR. Integrating anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease: current and future perspectives. *Am J Gastroenterol*, 2001 Jul; 96(7):1977-97.

9. Brandonisio O, Panaro MA, Fumarola I, Sisto M, Leogrande D, Acquafredda A, Spinelli R, Mitolo V. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. *Clin Exp Med*. 2002 Nov;2(3):125-9.

10. Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, de Oliveira Penna G, Lima Machado PR, Talhari S. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Feb; 84(2):255-60.

11. Carvalho LP, Passos S, Bacellar O et al. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol*, 2007 May ; 29(5): 251–258.

12. Chrusciak-Talhari A , Ribeiro-Rodrigues R, Talhari C et al. Case Report: Tegumentary Leishmaniasis as the Cause of Immune

Reconstitution Inflammatory Syndrome in a Patient Co-infected with Human Immunodeficiency Virus and *Leishmania guyanensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 81(4), 2009, pp. 559–564.

13. Coler RN and Reed SG. Second-generation vaccines against Leishmaniasis. *TRENDS in Parasitology*, vol.21 No.5 May 2005.

14. Croft SL and Coombs GH .Leishmaniasis– current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *TRENDS in Parasitology*, Vol.19 No.11 November 2003.

15. Desjeux P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat Q*,1992;45(2-3):267-75.

16. D'utra-e-Silva O. Sobre a leishmaniose tegumentar e seu tratamento. 1915. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 7:213-248.

17. Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today*. 1997 Oct; 18 (10):487-92.

18. EJ, et al. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Ver*, 1992;127:183-204.

19. El-On J. Current Status and Perspectives of the Immunotherapy of Leishmaniasis. *IMAJ* • VOL 11 • october 2009

20. Faria DR, Gollob KJ, Barbosa Jr J, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun*, Dec 2005;73(12):7853-9.

21. Guimarães LH, Machado PRL, Lago EL, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Carvalho EM. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (2009) 103, 712–715.

22. Gontijo B e Ribeiro de Carvalho ML. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1):71-80, jan - fev, 2003.

23. González U, Pinart M, Rengifo-Pardo M, Macaya A, Alvar J, Tweed JA Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 2, 2009.

24. Heinzl FP, Sadick MD, Mutha SS, Locksley RM. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 7011–7015.1991.

25. Jones TC, Johnson Jr WD, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis*, 1987;156(1): 73-83.

26. Kassiotis G, Kollias G. Uncoupling the pro inflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J Exp Med*, 2001 Feb 19;193(4):427-34.

27. Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D. The function of tumor necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Ann Rheum Dis*, 1999 Nov; 58 Suppl 1:I32-9.

28. Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1983;77(5):569-96.

29. Lessa HA, Machado P, Lima F, et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:87-9.

30. Machado PRL, Lessa H, Lessa M, Guimarães LH, Ho J, Carvalho EM. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: A randomized Trial for mucosal leishmaniasis. *Clinical Infectious diseases*, 44:788-93, 2007.

31. Machado PRL, Araújo, C, Silva A, Almeida R, D'Oliveira A, Bittencourt A, Carvalho EM. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clinical Infectious diseases*, 34:e69-73, 2002

32. Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araujo C, Carvalho EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol*, 2002 Sep-Oct; 12(5):449-51.

33. Machado PR, Rosa MEA, Costa D, Schriefer A, Carvalho EM. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, August, 2011; 105(8): 438-444.

34. Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, Sousa RS, Talhari A, Penna G, Carvalho EM. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A randomized and controlled trial. *www.plosntds.org* 1 December 2010 | Volume 4 | Issue 12 | e912.

35. Machado-Coelho G, Caiaffab W et al. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (2005) 99, 55–61.

36. Machado PRL, Rosa MEA, Schrief A. American tegumentary leishmaniasis in Bahia, Brazil . *Nederlands Tijdschrift Voor Dermatologie En Venerologie*, Volume 20. Numero 10. 2010.

37. Machado-Pinto J, Pinto J, Costa CA, Genaro O, Marques JM, Modabber F and Mayrink W. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. *International Journal of Dermatology* , 2002, 41, 73–78.

38. Martin JFB, Jiménez JL, Muñoz-Fernández MA. Pentoxifylline and severe acute respiratory syndrome (SARS): a drug to be considered. *Med Sci Monit.* 2003;9(6):SR41-6.
39. Miranda-Verastegui C, Tulliano G, Gyorkos TW, Calderon W, Rahme E, Ward B, Cruz M, Llanos-Cuentas A, Matlashewski G. First-line therapy for human cutaneous leishmaniasis in Peru using the TLR7 agonist Imiquimod in Combination with pentavalent antimony. *www.plosntds.org* 1 July 2009 | Volume 3 | Issue 7 | e491.
40. Morgan DJ, Guimarães LH, Machado PR, D'Oliveira A Jr, Almeida RP, Lago EL, Faria DR, Tafuri WL, Dutra WO, Carvalho EM. Cutaneous leishmaniasis during pregnancy: exuberant lesions and potential fetal complications. *Clin Infect Dis.* 2007; 45:478-82.
41. Murray H, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. , Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 2005; 366: 1561-77
42. Mayrink W, Schettini AP, Williams P, Raso P, Magalhães PA, Lima Ade O, Melo MN, da Costa CA, Genaro O, Dias M, et al Histological observations on Montenegro's reaction in man.. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1989 Jul-Aug; 31(4):256-61.
43. Neuner P, Klosner G, Pourmojib M, Knobler R, Schwarz T. Pentoxifylline in vivo and in vitro down-regulates the expression of the intercellular adhesion molecule-1 in monocytes. *Immunology*, Mar 1997;90(3):435-9.

44. Newlove T , Guimarães LH , Morgan DJ , Alcântara L , Glesby MJ , Carvalho EM, Machado PR. Antihelminthic therapy and antimony in cutaneous leishmaniasis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients co-infected with helminths and *Leishmania braziliensis* . *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 84(4), 2011, pp. 551-555

45. Oghumu S., Lezama-Dávila CM, Isaac-Márquez AP, Satoskar AR. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. *Exp. Parasitol*,(2010).

46. O'Neal SE, Guimarães LH, Machado PR, Alcântara L, Morgan DJ, Passos S, Glesby MJ, Carvalho EM, 2007. Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*,195: 142 – 148.

47. Ouellette M, Drummel-Smith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates*, 7 (2004) 257–266.

48. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura TK , Paes-Oliveira TM, Conceição-Silva F. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J. Clin. Invest*, volume 91, April 1993, 1390-1395.

49. Ribeiro de Jesus A, Luna T, Almeida RP, Machado PRL , Carvalho EM. Pentoxifylline down modulate in vitro T cell responses and attenuate pathology in *Leishmania* and HTLV-I infections. *International Immunopharmacology*, (2008) 8, 1344–1353.

50. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, 1998; 31(1):143-8.

51. Reed SG, Badaró R, Masur H, Carvalho EM, Lorengo R, Lisboa A, Teixeira R, Johnson WD Jr, Jones TC. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1986 Jan;35(1):79-85

52. Ritter U & Korner H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 2002, 24, 295-301.

53. Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *JID*, 2006:193 (15 May).

54. Sadeghian G, Nilforoushzadeh MA. Effect of combination therapy with systemic glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Dermatology*. 2006,45, 819-821.

55. Salhi A, Rodrigues V, et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in Cutaneous Lesions in Humans Infected with *Leishmania braziliensis*. *Immunology*, 2008, 180: 6139–6148.

56. Sher A, Gazzinelli RT, Oswald IP, Clerici M, Kullberg M, Pearce EJ, et al. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of

immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev* 1992;127:183-204.

57. Sundar S, Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, Ostyn B, Boelaert M, Dujardin JC, Chakravarty J. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clin Infect Dis*. 2012 Aug;55(4):543-50. Epub 2012 May 9.

58. Shirabe S, Nakamura T, Tsujino A, Nishiura Y, Furuya T, Goto H, et al. Successful application of pentoxifylline in the treatment of HTLV-I associated myelopathy. *J Neurol Sci*. 1997 Oct 3;151(1):97-101.

59. Soto J, Rea J, Balderrama M, Toledo J, Soto P, et al. (2008) Short report: Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 78: 210–211.

60. Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol*.2006;22:32-40.

61. Unger A, O'Neal S, Machado PR, Guimarães LH, Morgan DJ, et al. (2009) Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 80: 574– 579.

62. Vélez I , López L , Sánchez X , Mestra L , Rojas C , Rodríguez E. Efficacy of Miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis . *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 83(2), 2010, pp. 351–356

63. Witkamp R, Monshouwer M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. *Vet Q*, 2000 Jan; 22(1):11-6.

64. Weigle K and Saravia NG. Natural History, clinical evolution and the host-parasite interaction in new world cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology* 1996; 14:433450.

XII - ARTIGO SUBMETIDO

Clinical and immunological outcome in cutaneous leishmaniasis patients treated with pentoxifylline

Brito, Graça⁽¹⁾; Dourado, Mayra⁽¹⁾; Polari, Ludmila⁽¹⁾; Carvalho, Lucas P.^(1;2;3); Silva, Adriano⁽¹⁾; Carvalho, Edgar M.^(1;2); Machado, Paulo^(1;2) and Passos, Sara^{(1;2)*}

⁽¹⁾Serviço de Imunologia - Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos

⁽²⁾INCT-DT (National Institute of Science and Technology- Tropical Disease)

⁽³⁾Instituto de Ciência da Saúde da Universidade Federal da Bahia

Clinical and immunological outcome in cutaneous leishmaniasis patients treated with pentoxifylline

Graça Brito⁽¹⁾, Mayra Dourado⁽¹⁾, Ludmila Polari⁽¹⁾, Lucas P Carvalho^(1;2;3), Adriano Queiroz⁽¹⁾, Edgar M. Carvalho^(1;2), Paulo Machado^(1;2) and Sara Passos^{(1;2)*}

⁽¹⁾Serviço de Imunologia - Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos

⁽²⁾INCT-DT (National Institute of Science and Technology- Tropical Disease)

⁽³⁾Instituto de Ciência da Saúde da Universidade Federal da Bahia

ABSTRACT

Pentoxifylline is a TNF- α inhibitor that also attenuates the immune response and decrease tissue inflammation. The association of pentoxifylline with antimony improves the cure rate of mucosal and cutaneous leishmaniasis (CL). In this randomized and double blind clinical trial, therapeutic failure was higher than in patients who received pentoxifylline plus antimony. There was a significant decrease in TNF- α and CCL3 after therapy more evidence in the pentoxifylline group. The increased levels of CXCL9 and CXCL10 during therapy were lower in the pentoxifylline group. Therapy with pentoxifylline is associated with more pronounced changes in cytokine levels than in placebo group.

INTRODUCTION

Tegumentary leishmaniasis is a major public health problem in developing countries¹ and cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common form of the disease. The pathology in CL is associated with an exacerbated inflammatory response with high concentrations of TNF- α and IFN- γ found in supernatants of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and tissue^{2,3}. The participation of TNF- α in the pathogenesis of inflammatory and auto-immune diseases⁴ as well as in CL and mucosal leishmaniasis (ML) has been documented^{2,3}. In CL there is an association between production of this cytokine and development of cutaneous lesions⁵ and an association

between the frequency of cells expressing TNF- α and the size of the ulcer² Antimony is the drug of choice for treatment of leishmaniasis but, in areas of *L. braziliensis* transmission, therapeutic failure has been observed in up to 40% of the patients^{6,7}. Pentoxifylline is a methylxantine that was used primarily to treat for vascular disease⁸ but recently it has been used to treat chronic inflammatory diseases⁹. Pentoxifylline inhibits TNF- α production¹⁰ and the association of pentoxifylline plus antimony decrease the healing time of CL and ML^{11,12}, is more effective than antimony alone^{11,12} and cure MLs and CL patients refractory to antimony therapy¹³. So, the aim of this study was to associate changes in the immunological response with therapeutic use of pentoxifylline in CL.

This randomized placebo controlled clinical trial was performed in the Health Post of Corte de Pedra, Bahia, Brazil aimed to determine immunological changes associated with therapeutic response in CL and better understand how pentoxifylline contribute to the healing of *L. braziliensis* ulcers. Participants include 20 patients with presence of one to three ulcers, duration of illness between 1 to 3 months and documentation of *L. braziliensis* infection by parasite isolation or real time PCR. Patients were assigned to receive pentoxifylline and antimony (study group) or antimony plus placebo (control group) by a randomization table obtained in www.randomization.com. Intravenous antimony was given in a dose of 20mg/Kg a day associated to oral pentoxifylline (400mg) or placebo was given three times a day during 20 days. Immunologic studies were performed on day 0 and day 15. Peripheral blood mononuclear cells were obtained by hepanized venous blood. Cells were adjusted to the concentration of 10^7 /ml and aliquots of 10^6 cells were incubated in plates with or without addition of soluble leishmania antigen (SLA) at the concentration of 5 μ g/ml. After 72 hours supernatants were collected and TNF- α , CCL3, CXCL9 and CXCL10 were measured by ELISA

using reagents from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Results are expressed as pg/ml. Soluble leishmania antigen (SLA) was prepared from a strain isolated from a ML patient as previously described¹⁴.

Clinical outcomes: Cure or failure was determined on day 90. Cure was defined by complete healing of the lesions with re-epithelization of the skin. Failure was defined as persistence of ulceration, or infiltrated borders.

Statistical Analysis: The comparison between the immunological responses of the two groups – placebo and pentoxifylline was performed by Wilcoxon matched-pairs analysis and Kruskal-Wallis test was used for comparisons between three or more independent variables. A nonparametric test was chosen considering that the samples did not follow a Gaussian distribution. The significance level was defined as $P < 0.05$.

RESULTS

The demographic and clinical features of the 17 patients who participated of the study are shown on table 1. Three patients were excluded from the study because they missed the visit on day 15th, and blood could not be drawn for the second immunologic evaluation. There was no difference between the 2 groups regarding age, gender or number, size and localization of the lesions. The healing time was greater in the group that received only glucantime. While (14%) of patients failed in the group with antimony plus pentoxifylline, treatment failure was observed in 4 (44%) out of 9 patients with only received antimony ($P < 0.05$).

The concentration of TNF- α and chemokines before and after therapy in the 2 groups of patients are shown in figure 1. In the study group the median of TNF- α before therapy (Figure 1A) was 655pg/ml ranging from 405pg/ml to 971pg/ml and after therapy was 115pg/ml ranging from 100pg/ml to 166pg/ml ($P < 0.0001$). In the placebo group the median of TNF- α before therapy as 530 ranging from 402pg/ml to 790pg/ml and

dropped to 299pg/ml ranging from 160pg/ml to 383pg/ml ($P < 0.0001$). While the percentage of suppression of TNF- α production in the placebo group was 48%, in patients who received pentoxifylline the suppression was of the order of 79% ($P = 0.0004$). The levels of CCL3 in the 2 groups are shown in figure 1B. Although a significant decreasing in CCL3 levels after therapy was only observed in the pentoxifylline group, in the majority of the patients only a slight decrease was observed. Different from the observed with TNF- α and CCL3, the levels of CXCL9 and CXCL10 increased after cure. The median of CXCL9 levels before therapy in the study group was 190pg/ml ranging from 102pg/ml to 457pg/ml (Figure 1C) and after therapy was 418pg/ml ranging from 164pg/ml to 754pg/ml ($P=0.0008$). In the control group it was 173pg/ml ranging from 65pg/ml to 1677pg/ml and 1369pg/ml ranging from 426pg/ml to 2683pg/ml respectively ($P=0.009$). Regarding CXCL10 (Figure 1D) the medians before and after therapy in the pentoxifylline group were 220pg/ml and 338pg/ml ($P=0.07$) respectively. In the placebo group the increasing in CXCL10 was from 125pg/ml to 453pg/ml after therapy ($P=0.009$).

To determine if there was any association between cytokine level before and after therapy with the clinical outcomes we compare the measurements of these cytokines in patients who failed with those who cured independent of the type of therapy. As shown in figure 2 the levels of CXCL10 at day 15 of therapy in patients who fail 1369pg/ml (679pg/ml to 2683pg/ml) was higher ($P=0.02$) than in those who cured in 90 days (542pg/ml, 164 ± 2290).

DISCUSSION

This study extends previous evidences of the participation of the immunological response in the pathogenesis of CL and ML and the ability of pentoxifylline in association with antimony to improve the therapeutic response of CL patients. We also

showed that treatment with antimony was associated with a significant reduction in the TNF- α and CCL3 levels and increasing of CXCL9 and CXCL10. However the changes in TNF- α and chemokine levels were greater in patients treated with antimony plus pentoxifylline indicating that pentoxifylline down modulate not only TNF- α but also the production of these chemokines. Although our major aim was to better understand how pentoxifylline act on the immunologic response of CL patients our data also confirmed that pentoxifylline associated with antimony is more effective than antimony alone in the treatment of CL. Regarding the changes in the immunologic response one unexpected finding was the observation that while TNF- α and CCL3 levels fallen after therapy, CXCL9 and CXCL10 increased after therapy. The possible explanations for an increasing production of these chemokines after therapy include: 1) The release of leishmania antigen after therapy may increase production of CXCL9 and CXCL10; 2) The subpopulation of monocytes that produce TNF- α and CCL3 is different from the one that secret CXCL9 and CXCL10. Three populations of monocytes have been described. The majority of them are classic monocytes expressing low CD16 following the intermediate and non-classical monocytes that strong express CD16¹⁵. These non-classical monocytes produce more TNF- α than the intermediate and classical monocytes¹⁶ but it is not known the subpopulations that are responsible for the secretion of the chemokines studied here.

As therapy with antimony is performed for 20 days but patients are followed for up to 60 to 90 days for determination of cure and we observed here changes in TNF- α and chemokine level with 15 days of therapy it is possible that these changes may be used to predict therapeutic response to antimony. Actually we observed that CXCL9 levels at 15 day of therapy were lower in patients who cured than in patients who failed independent of the groups. Therefore despite the small number of patients CXCL9

levels during therapy may be a precocious marker of therapeutic failure. This is of utmost relevance as in such case a new drug or a prolonged course of antimony may be incorporated to the treatment in order to avoid clinical failure and future complications like mucosal or disseminated disease.

Table 1.

Variables	Glucantime plus Placebo (N=9)	Glucantime plus Pentoxifylline (N=8)	P Value*
Sex (% of male)	77	86	0.10
Age (M \pm SD)	30 \pm 10	28 \pm 5	0.64
# of lesions (M \pm SD)	1 \pm 0	1.7 \pm 0.5	0.11
Size of lesions	25x22	25x19	0.12
Time of Healing (Days) (M \pm SD)	103 \pm 22	81 \pm 4	0.18
Therapeutic Failure	4 (44%)	1 (14%)	0.05

Kruskal-Wallis test.

Figure Legends

Figure 1: TNF- α and Chemokine Level of Patients with Cutaneous Leishmaniasis Before and After Therapy with Antimony Associated to Pentoxifylline or Antimony plus Placebo.

TNF- α (Figure 1A), CCL3 (Figure 1B), CXCL9 (Figure 1C) and CXCL10 (Figure 1D) levels were measured by ELISA in supernates of PBMC stimulated with SLA on day 0 and day 15 of treatments with antimony plus placebo or antimony plus pentoxifylline.

Figure 2: CXCL9 levels after therapy of CL patients who cured or fail to antimony associated or not to pentoxifylline.

REFERENCES

1. WHO. 1998. Leishmaniasis. Tropical diseases Research.
2. D'Oliveira, A., Jr., P. Machado, O. Bacellar, L. H. Cheng, R. P. Almeida, and E. M. Carvalho. 2002. Evaluation of IFN-gamma and TNF-alpha as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 35:7.
3. Antonelli, L. R., W. O. Dutra, R. P. Almeida, O. Bacellar, E. M. Carvalho, and K. J. Gollob. 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* 101:226.
4. Dinarello, C. A. 1997. Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. *J Biol Regul Homeost Agents* 11:91.
5. Melby, P. C., F. J. Andrade-Narvaez, B. J. Darnell, G. Valencia-Pacheco, V. V. Tryon, and A. Palomo-Cetina. 1994. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 62:837.
6. Newlove, T., L. H. Guimaraes, D. J. Morgan, L. Alcantara, M. J. Glesby, E. M. Carvalho, and P. R. Machado. Antihelminthic therapy and antimony in cutaneous leishmaniasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients co-infected with helminths and *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 84:551.
7. Santos, J. B., A. R. de Jesus, P. R. Machado, A. Magalhaes, K. Salgado, E. M. Carvalho, and R. P. Almeida. 2004. Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous Leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis* 190:1793.
8. Ward, A., and S. P. Clissold. 1987. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs* 34:50.
9. Gutierrez-Reyes, G., P. Lopez-Ortal, S. Sixtos, S. Cruz, M. T. Ramirez-Iglesias, M. C. Gutierrez-Ruiz, F. Sanchez-Avila, E. Roldan, F. Vargas-Vorackova, and D. Kershenovich. 2006. Effect of pentoxifylline on levels of pro-inflammatory cytokines during chronic hepatitis C. *Scand J Immunol* 63:461.
10. Doherty, G. M., J. C. Jensen, H. R. Alexander, C. M. Buresh, and J. A. Norton. 1991. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery* 110:192.
11. Sadeghian, G., and M. A. Nilforoushzadeh. 2006. Effect of combination therapy with systemic glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol* 45:819.
12. Machado, P. R., H. Lessa, M. Lessa, L. H. Guimaraes, H. Bang, J. L. Ho, and E. M. Carvalho. 2007. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 44:788.
13. Lessa, H. A., P. Machado, F. Lima, A. A. Cruz, O. Bacellar, J. Guerreiro, and E. M. Carvalho. 2001. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg* 65:87.
14. Reed, S. G., R. Badaro, H. Masur, E. M. Carvalho, R. Lorenco, A. Lisboa, R. Teixeira, W. D. Johnson, Jr., and T. C. Jones. 1986. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 35:79.

15. Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn, and M. B. Lutz. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116:e74.
16. Zawada, A. M., K. S. Rogacev, B. Rotter, P. Winter, R. R. Marell, D. Fliser, and G. H. Heine. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118:e50.

Figure 1A

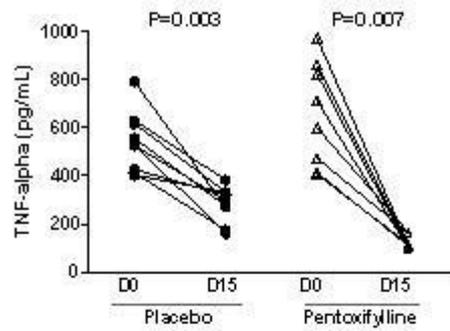


Figure 1B

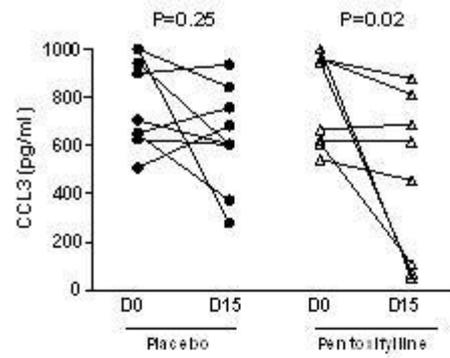


Figure 1C

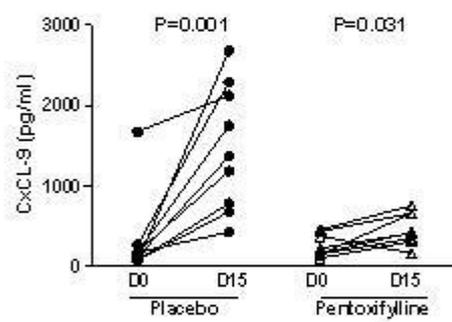
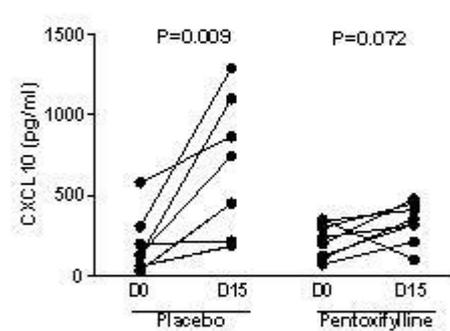


Figure 1D



-----Mensagem original-----

De: onbehalfof+ajtmh@hotmail.com@manuscriptcentral.com

[mailto:onbehalfof+ajtmh@hotmail.com@manuscriptcentral.com] Em nome de ajtmh@hotmail.com

Enviada em: terça-feira, 4 de dezembro de 2012 15:24

Para: edgar@ufba.br; imuno@ufba.br

Assunto: Manuscript submitted - AJTMH-12-0729

04-Dec-2012

Re: AJTMH-12-0729 Manuscript ID

Dear Dr. Edgar Carvalho:

This is to acknowledge that the above manuscript has been received by the American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Please refer to this number in all your future correspondence with the Journal office.

Your user name is: imuno@ufba.br

Your password may be found by using the password help function on the log-in page.

FOR ORIGINAL SUBMISSIONS:

This information refers to ORIGINAL SUBMISSIONS only. If this is a revised manuscript, please skip to the REVISIONS section of this letter below.

Please verify the following information and notify the journal office immediately if there are any discrepancies:

Manuscript type: Short Report

Title: Clinical and immunological outcome in cutaneous leishmaniasis patients treated with pentoxifylline

Authors: Brito, Graça; Dourado, Mayra; Polari, Ludmila; Carvalho, Lucas; Queiroz, Adriano; Carvalho, Edgar; Machado, Paulo; Passos, Sara

Number of tables: 1

Number of figures: 2

Word count: 1485

Right running head: Treatment with pentoxifylline in CL patients

If you have not done so already, please be sure to download and sign the journal copyright form and return it to the journal office by fax or mail. This form can be accessed on the <http://mc.manuscriptcentral.com/ajtmh> site under the "Instructions and Forms" link. We also require the signatures of all contributing authors on the cover letter indicating that they participated in the study and concur with the submission and subsequent revisions submitted by the corresponding author.

There are page charges for publication in the Journal.

You will receive a separate e-mail from the journal office staff indicating your estimated page charges. Page charges do not apply to book reviews, CD reviews, Letters to the Editor, editorials, Images in Clinical Tropical Medicine and invited review articles. In addition, individual authors are usually not assessed page charges for articles that will appear in a supplement to the journal.

If you are not already a member of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH), now would be a good time to join. Members receive a subscription to the journal, a reduction in page charges, and access to a professional network of peers in the field of tropical medicine. For information on membership, please visit http://www.astmh.org/Join_ASTMH.htm.

FOR REVISIONS:

Thank you for submitting your revised manuscript to the journal. The revised manuscript may need to go out for review again. We will keep you updated on its status.

Thank you for your interest in The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.

Sincerely,
Danielle Buckley

Danielle Buckley
Editorial Assistant
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene
ajtmh@hotmail.com

XIII.1 - Anexo 1:**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nome do estudo: Imunoterapia na Leishmaniose Cutânea.

Investigador Principal: Paulo Roberto Lima Machado, médico, Serviço de Imunologia, 5º andar, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia.

Instituição: Universidade Federal da Bahia.

Telefone: 32377353

Convite e Objetivo: Você é convidado a participar de um estudo para avaliar a resposta ao tratamento da Leishmaniose Tegumentar (Ferida “braba” ou “Leshe”) com a pentoxifilina associada ao antimonial pentavalente (Glucantime). Você vai receber um medicamento (Glucantime), recomendado pelo Ministério da Saúde (MS), no tratamento da Leishmaniose Tegumentar com as doses dentro das especificações deste Ministério; (MS, 2000). O presente estudo destina-se a avaliar se a associação de um outro medicamento chamado Pentoxifilina poderá curar mais rápido e de maneira mais eficiente a sua doença. O tratamento com Glucantime será realizado com uma série de 20 injeções diárias por via intra-venosa; a associação com a Pentoxifilina será feita com 3 cápsulas por dia durante 20 dias.

Participação Voluntária: A sua participação neste estudo é voluntária. Caso você não queira participar deste estudo não haverá qualquer tipo de problema ou perda de benefícios a que você tenha direito. Você pode se retirar deste

estudo a qualquer momento, sem qualquer problema, e continuará tendo direito ao tratamento gratuito da Leishmaniose com Glucantime.

Procedimentos: Concordando com a participação no estudo, faremos o seguinte:

- 1 - Preenchimento da ficha individual (informações sobre sua doença);
- 2 - Vamos coletar 20 ml de sangue venoso com seringa descartável, para realização de exames de laboratório, com a finalidade de avaliar a resposta do meu organismo ao parasito e ao tratamento. A retirada de sangue implica em dor pela picada da agulha no momento da coleta;
- 3 - Para confirmação do diagnóstico se procederá a coleta de exames com os procedimentos recomendados pelo Ministério da Saúde (M.S., Brasil, 2000) através de aspirado ou biópsia de lesão na pele para:
 - 3.1 - Histopatologia das lesões e PCR;
 - 3.2 - Isolamento do parasito em meios de cultura.
- 4- Serão feitas duas avaliações de exame de sangue (no início do tratamento e após 15 dias) para controle laboratorial.

Duração do estudo: Você deverá voltar ao Posto de Saúde 15 dias após o início do tratamento e uma vez por mês nos 3 primeiros meses. A última avaliação clínica será 1 ano após o tratamento.

Confidencialidade: A participação neste estudo será confidencial e os registros ou resultados dos testes relacionados ao estudo serão mostrados apenas aos participantes e aos representantes da UFBA. Os resultados do estudo serão apresentados em órgãos de divulgação pública como congressos e eventos científicos, sem identificar os pacientes do estudo.

Benefícios e Riscos: Participando do estudo, o paciente ou a família não obterão quaisquer benefícios adicionais além dos já citados (diagnóstico da infecção e/ou doença).

- I. A biópsia é um procedimento utilizado de rotina no diagnóstico da Leishmaniose que implica em dor local, apenas na aplicação de anestesia, e posterior retirada de fragmento de pele com material esterilizado, obedecendo todas as normas de segurança e assepsia e que poderá ocorrer sangramento em pequena quantidade. A realização da biópsia de pele será feita apenas por médicos ou acadêmicos de medicina sob supervisão dos médicos participantes do referido projeto.
- II. O Glucantime e a Pentoxifilina são medicamentos que tem sido usados na leishmaniose e em outras doenças com bom nível de segurança. Os efeitos colaterais mais comuns que podem acontecer em algumas pessoas são: dor de cabeça, dor nas “juntas” ou enjôos. Na maioria das vezes são considerados leves e desaparecem mesmo sem interromper o tratamento. O tratamento poderá ser encerrado caso ocorram efeitos adversos além dos esperados e que possam prejudicar os pacientes.

Custos: Você não terá nenhum custo para participar deste estudo. Você terá direito a ressarcimento de gastos, em caso de prejuízo relacionado a este estudo.

Esclarecimentos: Você têm direitos aos esclarecimentos que julgarem necessários a qualquer período do desenvolvimento deste estudo. O Dr. Paulo Machado, cujo número de telefone é 71-32377353, terá disponibilidade para atender e esclarecer possíveis dúvidas. No Posto de Saúde de Corte de Pedra, o Sr. Ednaldo Lago pode ajudar a esclarecer dúvidas. Você também pode obter informações sobre a condução ética deste estudo com o Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira, no 1º andar do Hospital

Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia, telefone: 71-32838043.

Consentimento: Afirmo estar devidamente esclarecido sobre o conteúdo deste termo e ter recebido uma cópia para guardar. Pelo presente, consinto voluntariamente em participar deste estudo.

Nome _____

Assinatura do paciente/data/hora

_____ / ____ / _____

Assinatura do pesquisador/data/hora

_____ / ____ / _____

Assinatura da testemunha/data/hora

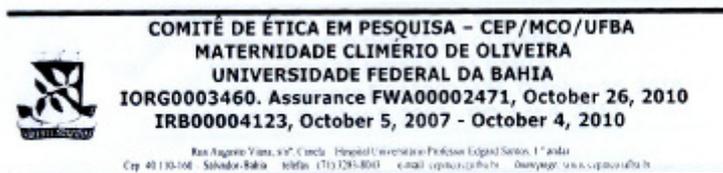
_____ / ____ / _____

Impressão dactiloscópica

(p/ pessoa não alfabetizada)

XIII.2 - Anexo 2:

APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



PARECER/RESOLUÇÃO N.º 078/2009

Registro CEP. 086/09. (Este número, bem como o do Parecer, só na forma em citados nos correspondências referentes a este projeto).

Título do Projeto. "Imunoterapia na Leishmaniose Cutânea."

Patrocínio/Financiamento. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Programa de Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia. Orçamento expressivo, compatível, com contrapartida Institucional.

Pesquisador Responsável. Doutor, **Paulo Roberto Lima Machado**, Pesquisador no Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos, Universidade Federal de Medicina. **Equipe complementar relacionada no Protocolo. "Curricula Vitae"** apensos.

Instituição. Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, SIM/C-HUPES/UFBA.

Área do Conhecimento. 4.00, Ciências da Saúde; 4.01, Medicina; Nível: Terapêutico, T; Grupo III.

Objetivos. Avaliar em um ensaio clínico controlado de fase III o uso da pentoxifilina associada ao antimonial no tratamento da Leishmaniose Cutânea (LC).

Sumário. Ensaio clínico controlado, randomizado, duplo-cego, comparando a associação de pentoxifilina (substância comercializada) com antimonial pentavalente (**grupo de estudo**), com placebo associado ao antimonial pentavalente (**grupo controle**) no tratamento da forma cutânea da LTA. Pretende-se que 164 (cento e sessenta e quatro) — Cálculo da Amostra — pacientes de ambos os sexos, portadores de LC e livremente participativos, adultos até 65 (sessenta e cinco) anos, divididos em 02 (dois) grupos de 82 (oitenta e dois) pacientes. **Estudo**, (emprego da pentoxifilina com antimonial pentavalente), e **Controle** (placebo com antimonial), sejam acompanhados entre Setembro de 2009 a Setembro de 2010, segundo **CrITÉrios de Inclusão e Exclusão, Terapêutica Aplicada, Acompanhamento e Análises Estatísticas Especificadas**. Considerações éticas; **"Impactos científico, tecnológico e social" esperados**; as **Referências Bibliográficas** numerosas e o **Cronograma** completam o Protocolo. **"Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido" (TCLPE)** ético.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
IORG0003460. Assurance FWA00002471, October 26, 2010
IRB00004123, October 5, 2007 - October 4, 2010

Rua Augusto Viana, s/nº, Centro – Hospital Universitário Professor Edgard Souto, 1º andar
 Cep: 40.110-160 - Salvador-Bahia telef: (71) 3203-8040 e-mail: comco@ufba.br homepage: www.comco.ufba.br

Comentários. Na “Folha de Rosto” o Projeto foi, corretamente, caracterizado como “Novo Fármaco” — nova indicação terapêutica de medicação já licenciada, em continuação observacional — Grupo II e fase III. **Protocolo aprovável.**

APROVADO

Salvador, 16 de Setembro de 2009


 Professor, Doutor, Antônio dos Santos Barata,
 Coordenador - CEP/MCO/UFBA

Observações importantes. Toda a documentação anexa ao Protocolo proposto e rubricada pelo (a) Pesquisador (a), arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da Secretária deste (a) ao (à) mesmo (a), faz parte intrínseca deste Parecer/Resolução e nas “Recomendações Adicionais” apenas, **bem como a impostergável entrega de relatórios parciais e final como consta nesta liberação**, (Modelo de Redação para Relatório de Pesquisa, anexo).

XIII-3 - Anexo 3: ESCALA CTCAE

Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0 (CTCAE)

Publish Date: May 28, 2009

<p>Quick Reference</p> <p>The NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events is a descriptive terminology which can be utilized for Adverse Event (AE) reporting. A grading (severity) scale is provided for each AE term.</p> <p>Components and Organization</p> <p>SOC</p> <p>System Organ Class, the highest level of the MedDRA hierarchy, is identified by anatomical or physiological system, etiology, or purpose (e.g., SOC Investigations for laboratory test results). CTCAE terms are grouped by MedDRA Primary SOCs. Within each SOC, AEs are listed and accompanied by descriptions of severity (Grade).</p> <p>CTCAE Terms</p> <p>An Adverse Event (AE) is any unfavorable and unintended sign (including an abnormal laboratory finding), symptom, or disease temporally associated with the use of a medical treatment or procedure that may or may <u>not</u> be considered related to the medical treatment or procedure. An AE is a term that is a unique representation of a specific event used for medical documentation and scientific analyses. Each CTCAE v4.0 term is a MedDRA LLT (Lowest Level Term).</p>	<p>Definitions</p> <p>A brief definition is provided to clarify the meaning of each AE term.</p> <p>Grades</p> <p>Grade refers to the severity of the AE. The CTCAE displays Grades 1 through 5 with unique clinical descriptions of severity for each AE based on this general guideline:</p> <p>Grade 1 Mild; asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated.</p> <p>Grade 2 Moderate; minimal, local or noninvasive intervention indicated; limiting age-appropriate instrumental ADL*.</p> <p>Grade 3 Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of hospitalization indicated; disabling; limiting self care ADL**.</p> <p>Grade 4 Life-threatening consequences; urgent intervention indicated.</p> <p>Grade 5 Death related to AE.</p> <p>A Semi-colon indicates 'or' within the description of the grade.</p> <p>A single dash (-) indicates a grade is not available.</p>	<p>Not all Grades are appropriate for all AEs. Therefore, some AEs are listed with fewer than five options for Grade selection.</p> <p>Grade 5</p> <p>Grade 5 (Death) is not appropriate for some AEs and therefore is not an option.</p> <p>Activities of Daily Living (ADL)</p> <p>*Instrumental ADL refer to preparing meals, shopping for groceries or clothes, using the telephone, managing money, etc.</p> <p>**Self care ADL refer to bathing, dressing and undressing, feeding self, using the toilet, taking medications, and not bedridden.</p>
---	---	--